

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUINE ROSELE RENAUD VIDAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA DOS ENTEROVÍRUS E
PARECHOVÍRUS HUMANOS CAUSADORES DAS MENINGITES VIRAIS NO
MUNICÍPIO DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, NO PERÍODO DE
JULHO DE 2005 A DEZEMBRO DE 2006

CURITIBA

2011

LUINE ROSELE RENAUD VIDAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA DOS ENTEROVÍRUS E
PARECHOVÍRUS HUMANOS CAUSADORES DAS MENINGITES VIRAIS NO
MUNICÍPIO DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, NO PERÍODO DE
JULHO DE 2005 A DEZEMBRO DE 2006

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutora
em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dra. Iara José Taborda de
Messias-Reason.

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Monteiro de
Almeida.

CURITIBA

2011

V648

Vidal, Luine Rosele Renaud

Caracterização molecular e epidemiológica dos enterovírus e parechovírus humanos causadores das meningites virais no município de Curitiba e região metropolitana, no período de julho de 2005 a dezembro de 2006 / Luine Rosele Renaud Vidal – Curitiba, 2011.

136 f.: il. (algumas color.); 30 cm.

Orientadora: Professora Dra. Iara José Taborda de Messias-Reason

Coorientador: Professor Dr. Sérgio Monteiro de Almeida

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Meningite Viral. 2. Enterovírus. 3. Parechovírus. 4. Humanos. 5. Líquido cefalorraquidiano. 6. RT-PCR. 7. Análise de sequência de DNA. I. Messias-Reason, Iara José Taborda de. II. Almeida, Sérgio Monteiro de. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 614.4

TERMO DE APROVAÇÃO

LUINE ROSELE RENAUD VIDAL


Título: **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA E DOS ENTEROVIRUS E PARECHOVIRUS HUMANOS CAUSADORES DAS MENINGITES VIRAIS NO MUNICÍPIO DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA, NO PERÍODO DE JULHO DE 2005 A DEZEMBRO DE 2006**

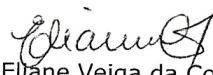
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análise Clínicas.


Prof. Dr. Sérgio Monteiro de Almeida
(Co-orientador/Presidente)


Profa. Dra. Maria Suely Soares Leonart
(Universidade Federal do Paraná)


Profa. Dra. Meri Bordignon Nogueira
(Universidade Federal do Paraná);


Dra. Sueli Massumi Nakatani
(Laboratório Central do Estado Lacen-/PR)


Dra. Eliane Veiga da Costa
(Fundação Oswaldo Cruz)

Curitiba, 07 de dezembro de 2011.

Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela, mas há também aquelas que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol.

Pablo Picasso

Dedico este trabalho aos meus queridos filhos, que enriquecem minha vida de todas as maneiras, e para meus pais e esposo, pelo incentivo e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e todos que me incentivaram para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos coordenadores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Prof.^a Dra. Marilis Dalarmi Miguel e Prof. Dr. Roberto Pontarolo.

Aos meus orientadores, Prof.^a Dra. Iara José Taborda de Messias-Reason e Prof. Dr. Sérgio Monteiro de Almeida, pelos ensinamentos e a disponibilidade em ajudar em todos os momentos.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Virologia do HC-UFPR, Meri, Sonia, Gisa, Bárbara, Indianara, Clyete, Luciane, Adelina, Marcirene, Carla, Luís e Naiara, pela amizade e incentivo.

Às amigas Líbera (HC-UFPR), Sueli e Maria do Carmo (Lacen-PR), que me auxiliaram no desenvolvimento dos sequenciamentos genômicos.

À Suzana, Laboratório Mantis – Diagnósticos Avançados pela amizade e incentivo.

Às estagiárias do projeto “Meningites”, Inajara, Lauriane e Norberto, pelo suporte técnico.

Aos colegas do Laboratório de Imunoquímica do HC-UFPR, pelas análises do lactato no LCR, e à residente Juliana.

À Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, nossa parceira no projeto “Meningites”, em especial à Josiane Maria Reimann Araújo e Cléa Elisa Lopes Ribeiro.

À Biometrix e ao Sr. Hallison de Almeida, que nos forneceu os kits de PCR em tempo real, e à assessoria científica dos colegas Marcelo Mion e Mauricio Cichon.

Aos pacientes, que embora anônimos, muito contribuíram para a realização deste projeto.

À Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI), pela aprovação do projeto “Meningites” e a disponibilização de capital, o qual foi utilizado para a criação do Laboratório de Biologia Molecular para Doenças Infeciosas do HC-UFPR.

Luine Rosele Renaud Vidal

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.*

Ricardo Reis

RESUMO

As meningites podem ser causadas por vários agentes etiológicos, sendo as enteroviroses importantes patógenos neurotrópicos em seres humanos. Aproximadamente 90% dos casos de meningites virais são devidos ao grupo dos enterovírus (EV) como coxsackievirus e echovirus que incluem vários sorotipos. Aproximadamente 50% dos internamentos por meningites, nos hospitais de Curitiba, são atribuídos à etiologia viral e 46% desses diagnósticos foram baseados apenas na contagem diferencial de células do líquido cefalorraquidiano (LCR). O presente estudo tem como objetivo definir o perfil epidemiológico e caracterizar molecularmente os EV e parechovírus humano (HPeV), utilizando-se amostras de LCR coletadas de pacientes com sinais e sintomas de meningite viral. Coletou-se 440 amostras de LCR de 3 hospitais da cidade de Curitiba no período de julho de 2005 a junho de 2006. As metodologias utilizadas para o detecção do segmento do genoma 5' não codificador (5' NC) do EV ou HPeV foram a transcrição reversa seguida da PCR (RT-PCR) e para o sequenciamento genético, pesquisou-se o gene VP1 para posterior análise filogenética. Além disso, as características bioquímicas e de celularidade do LCR e a coleta dos dados epidemiológicos anotados na ficha epidemiológica, foram analisados. Os EV ou HPeV foram detectados em 49/440 (11%) das amostras de LCR obtidas de pacientes com suspeita clínica de meningite viral por meio da metodologia de RT-PCR. Algumas amostras foram selecionadas e analisadas pela metodologia de PCR em tempo real. A análise das características operacionais da RT-PCR e PCR em Tempo Real definiram os padrões de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, taxa de falso positivo, valor presuntivo positivo, razão de detecção, índice de Youden, razão de erro, erro combinado, razão de verossimilhança positiva e negativa. Observou-se que as amostras positivas por RT-PCR, quando analisadas por meio da metodologia de PCR em Tempo Real, apresentaram uma carga viral mais elevada do que negativas. Observou-se um predomínio de amostras positivas nos intervalos de idades de 7 a 14 anos (41%) e 4 a 6 anos (28,6%), uma paciente de 3 meses apresentou infecção mista por EBV e EV. Ocorreu uma maior circulação dos EV e HPeV nos meses de verão. Por meio do ensaio de sequenciamento genômico observou-se a ocorrência dos tipos virais echovirus 30, echovirus 4 e HPeV. Sendo este o o primeiro relato da circulação do HPeV no Estado do Paraná. Houve uma predominância de amostras negativas (89%), indicando que alguns fatores limitaram a detecção do genoma viral. Observou-se que as amostras negativas apresentaram um número de hemácias significativamente maiores, o tempo de coleta após o início dos sintomas, nessas amostras foi menor em relação às amostras positivas. Além disso, outros agentes, como, bactérias, fungos e parasitas podem ser agentes etiológicos das meningites. Neste estudo, utilizou-se as metodologias de RT-PCR e PCR em Tempo Real para a identificação dos EV e HPeV nas amostras de LCR nos pacientes com suspeita clínica de meningite viral. A genotipagem por meio da metodologia de RT-PCR e o sequenciamento genômico da porção VP1 apresentaram as vantagens de conveniência, rapidez e acurácia. O que permitirá a investigação dos EV ou HPeV e os diferentes sorotipos ou genótipos associados a surtos e complicações clínicas.

Palavras-chave: Meningite Viral. Enterovírus Humano. Parechovírus Humano. Líquido cefalorraquidiano. RT-PCR. PCR em Tempo Real. Sequenciamento Genômico.

ABSTRACT

Neurotropic enteroviruses are important human pathogens of meningitis and around 90% of the cases are due to coxsackievirus and echovirus. In Curitiba approximately 50% of hospitalization cases of meningitis are attributed to viruses which were diagnosing mainly (46%) based on differential cell count of cerebrospinal fluid (CSF). The aim of the study was to define the epidemiological profile and the molecular characterization of enterovirus (EV) and human parechovirus HPeV, in CSF samples collected from patients with signs and symptoms of viral meningitis. A total of 440 CSF samples were collected from three hospitals in the period of July 2005 to June 2006. The detection of the genomic portion 5' non-coding (5'NCR) of the EV genome was performed using reverse transcription followed by PCR (RT-PCR). In addition, VP1 gene was amplified for further phylogenetic analysis. Cellular and biochemical characteristics of CSF, as well as, epidemiological were also analyzed. EV or HPeV were detected in 49/440 (11%) of the by RT-PCR methodology. Some were analyzed by the methodology of real time PCR. The analysis of the operational characteristics of the RT-PCR and Real-Time PCR include the following parameters of sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, false positive rate, value presumptive positive rate of detection, Youden index, ratio error, combined error, likelihood ratio positive and negative. Positive samples for EV and HPeV by RT-PCR showed higher viral load than negative samples. There was a predominance of positive samples in the range of age 7 to 14 years (41%) and 4 to 6 years (28.6%). A patient with three months old presented mixed infection by EBV and EV. A higher circulation of the EV and HPeV was observed during the summer months. By genomic sequencing the types: echovirus 30, echovirus 4 and HpeV were detected. The predominance of negative results (89%) in the study indicates that some factors limited the detection of viral genome in CSF samples. In fact, negative samples had a significantly higher number of red blood cells and the collection time after the onset of symptoms in these samples was lower compared to the positive samples. In addition, other agents, such as bacteria, fungi and parasites could also be related to the etiologic agents of meningitis. In this study, it were used the methodologies of RT-PCR and real time PCR to identify EV and HPeV in CSF samples from patients suspected of viral meningitis. The genotyping by RT-PCR and VP1 sequencing have the advantage of convenience, speed and accuracy. This will allow examination of EV or HPeV and serotypes or genotypes associated with outbreaks and significant disease with clinical complications.

Keywords: Viral Meningitis. Human Enterovirus. Human Parechovirus. Cerebrospinal fluid. RT-PCR. Real Time PCR. Genomic Sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	GENOMA DOS PICORNAVIRUS E MAPA ESQUEMÁTICO DOS GÊNEROS ENTEROVÍRUS E PARECHOVÍRUS HUMANOS, PRODUTO DAS POLIPROTEÍNAS E SUAS FUNÇÕES.....	24
FIGURA 2 –	CICLO REPLICATIVO DOS ENTEROVÍRUS	25
FIGURA 3 –	PATOGÊNESE DOS ENTEROVÍRUS	27
FIGURA 4 –	DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS CASOS NOTIFICADOS DE MENINGITES VIRAIS EM CURITIBA POR BAIRROS.....	39
FIGURA 5 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DE ALGUNS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO SEGMENTO 5' NC DOS ENTEROVÍRUS.....	47
FIGURA 6 –	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ANÁLISE DO LCR POR BIOLOGIA MOLECULAR.....	61
FIGURA 7–	ALGORITMO DA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DO GRUPO DE ESTUDO E GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E POSITIVO PARA OUTROS VÍRUS	74
FIGURA 8 –	TOTAL DE AMOSTRAS COLETADAS E POSITIVAS POR RT-PCR PARA EV/HPeV NO PERÍODO DO ESTUDO, 2005 à 2006.....	74
FIGURA 9 –	DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA EV E HPeV SELECIONADAS POR IDADE	75
FIGURA 10 –	DISTRIBUIÇÃO MENSAL DE AMOSTRAS POSITIVAS POR RT-PCR PARA EV/HPeV NO PERÍODO DO ESTUDO EM RELAÇÃO À TEMPERATURA MÉDIA MENSAL E ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO ...	78
FIGURA 11 –	TAMANHO DOS PRODUTOS OBTIDOS APÓS RT-PCR PARA EV/HPeV, AMOSTRAS TESTADAS, CONTROLES POSITIVO, NEGATIVO E INTERNO	79
FIGURA 12 –	GRÁFICO REPRESENTANDO UM RESULTADO DE PCR EM TEMPO REAL DE UMA AMOSTRA POSITIVA DO ESTUDO	80
FIGURA 13 –	DEMONSTRAÇÃO DA FORMAÇÃO DE PLACAS DE LISE EM CÉLULAS VERO PELO ENTEROVÍRUS.....	83

FIGURA 14 – GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO OS SINAIS DOS SOBRENADANTES DE CULTURA DILUÍDOS NO LOG ₁₀	85
FIGURA 15 – DENDOGRAMA DAS AMOSTRAS DE LCR DO ESTUDO E REFERÊNCIAS UTILIZANDO-SE O MÉTODO DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA	87
FIGURA 16 – DENDOGRAMA BASEADO NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA PROTEÍNA VP1 EVIDENCIANDO AS AFINIDADES GENÉTICAS DO ECHOVIRUS 30 DAS AMOSTRAS DO ESTUDO COM SEQUÊNCIAS DE OUTROS PAÍSES.	88
FIGURA 17 – DENDOGRAMA BASEADO NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA PROTEÍNA VP1 EVIDENCIANDO AS AFINIDADES GENÉTICAS DOS SUBGRUPOS DE ECHOVIRUS 30	90
FIGURA 18 – SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS ECHO30 DO ESTUDO EM RELAÇÃO À SEQUÊNCIA DE REFERÊNCIA DO GRUPO 4a ..	91
FIGURA 19 – DENDOGRAMA BASEADO NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA PROTEÍNA VP1 EVIDENCIANDO AS AFINIDADES GENÉTICAS DOS ECHOVIRUS 4	92
FIGURA 20 – DENDOGRAMA BASEADO NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA PROTEÍNA VP1 EVIDENCIANDO AS AFINIDADES GENÉTICAS DOS DO HPeV POR MEIO DO MÉTODO DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA	93
FIGURA 21 – GRÁFICO DO NÚMERO DE HEMÁCIAS E RESULTADOS DE RT-PCR	96
FIGURA 22 – GRÁFICO DO NÚMERO DE HEMÁCIAS E RESULTADOS DE PCR EM TEMPO REAL	97
FIGURA 23 – GRÁFICO DO NÚMERO DE AMOSTRAS DE LCR POR RT-PCR NEGATIVAS E POSITIVAS DE ACORDO COM O TEMPO DE COLETA (EM DIAS) APÓS O INÍCIO DOS SINTOMAS	97
FIGURA 24 – GRÁFICO DO NÚMERO DE AMOSTRAS DE LCR POR PCR EM TEMPO REAL NEGATIVAS E POSITIVAS DE ACORDO COM O TEMPO DE COLETA (EM DIAS) APÓS O INÍCIO DOS SINTOMAS	98

FIGURA 25 – COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA DAS MENINGITES VIRIAIS POR BAIRROS CURITIBA E REPRESENTAÇÃO ESPACIAL DOS CASOS COLETADOS E POSITIVOS NO ANO DE 2006.....	99
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – INTERVALO DE IDADES PARA PACIENTES POSITIVOS E NEGATIVOS PARA EV E HPeV	75
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE LCR RT-PCR NEGATIVAS E POSITIVAS PARA EV/HPeV	77
TABELA 3 – DINÂMICA DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL E DILUIÇÕES SERIADAS DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE ENTEROVÍRUS	84
TABELA 4 – COMPARAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CARACTERÍSTICAS DE LCR DOS EV E HPeV.....	95

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS ENTEROVÍRUS	22
QUADRO 2 – CARACTERÍSTICAS DO LCR NORMAL E PRINCIPAIS ALTERAÇÕES NAS MENINGITES.....	40
QUADRO 3 – AGENTES ETIOLÓGICOS DAS MENINGITES VIRAIS.....	44
QUADRO 4 – PONTUAÇÃO PARA MENINGITES BACTERIANAS E CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO PARA MENINGITES VIRAIS	58
QUADRO 5 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DA PORÇÃO 5'NC DO ENTEROVÍRUS SUAS CARACTERÍSTICAS.	65
QUADRO 6 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO E SUAS CARACTERÍSTICAS	70

QUADRO 7 – ANÁLISES DAS AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS POR RT-PCR E PCR EM TEMPO REAL.....	81
QUADRO 8 – COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DAS METODOLOGIAS DE PCR CONVENCIONAL E PCR EM TEMPO REAL PARA EV/HPeV.....	82
QUADRO 9 – ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DA METODOLOGIA DE RT-PCR	82
QUADRO 10 – ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DA METODOLOGIA DE PCR EM TEMPO REAL	83
QUADRO 11 – ESTIMATIVA DA DIVERGÊNCIA DA EVOLUÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE ECHOVIRUS TIPO 30.....	89
QUADRO 12 – DIVERGÊNCIA EVOLUCIONÁRIA ESTIMADA ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE HPeV..	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BANPESQ	Banco de pesquisa
bDNA	branched-DNA
BHE	Barreira hematoencefálica
CAV	Vírus coxsakie A
CBV	Vírus coxsakie B
° C	Grau Celsius
CDC	Center for Diseases Control
cDNA	DNA complementar
CEMA	Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemia
CI	Intervalo de confiança
CMC	Carboxi-metilcelulose
CMV	Citomegalovirus
CPE	Controle interno
ddp	Diferença de potencial
dL	Decilitro
DNA	Ácido Desoxirribonucleico

DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Dideoxynucleosídeo
DTT	Ditiotreitol
EBV	Vírus Epstein Barr
ECHO	Echovirus
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EUA	Estados Unidos da América
EV	Enterovírus
GuSCN	Tiocianato de Guanidina
HC-UFPR	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
HCl	Ácido clorídrico
HEV-A	Enterovírus humano tipo A
HEV-B	Enterovírus humano tipo B
HEV-C	Enterovírus humano tipo C
HEV-D	Enterovírus humano tipo D
HHV-6	Vírus herpes humano tipo 6
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
H ₂ O	Água
HPeV	Parechovírus humano
HPP	Hospital Pequeno Príncipe
HSV-1	Vírus herpes simplex tipo 1
HSV-2	Vírus herpes simplex tipo 2
HUEC	Hospital Universitário Evangélico de Curitiba
IQR	Interquartis
Kb	Kilobase
KCl	Cloreto de potássio
L	Litro
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LCV	Vírus da coriomeningite linfocítica
MEM	Meio mínimo essencial
DP	Desvio padrão
mG	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mmol/L	Milimol por litro

mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
mRNA	RNA mensageiro
NASBA	Amplificação baseada na sequência de ácidos <i>nucléicos</i>
NESS	Sistema Nacional de Vigilância dos enterovírus
ng/dL	Nanogramas por decilitro
nm	Nanomol
NREVSS	Sistema Nacional de Vigilância de Vírus Respiratórios e Entéricos - EUA
NC	Não codificadora
OR	<i>Odds ratio</i>
ORF	<i>Open reading frame</i> – fase aberta de leitura
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFU	Unidade formadora de placa
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
PV	Poliovirus
PRV	Vírus da Pseudo Raiva
qsp	Quantidade suficiente para
RNA	Ácido ribon <u>ucléico</u>
RT-PCR	Transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase
RI	Replicativa intermediária
SBF	Soro fetal bovino
SMS	Secretaria Municipal de Saúde
SNC	Sistema nervoso central
TBE	Tris EDTA
U	Unidade
VPg	Proteína viral g
VZV	Vírus varicela zoster
μG	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	19
1.2 JUSTIFICATIVA	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 CLASSIFICAÇÕES DOS ENTEROVÍRUS E PARECHOVÍRUS	21
2.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E CICLO REPLICATIVO DOS PICORNAVÍRUS	23
2.3 PATOGÊNESE DOS PICORNAVÍRUS	26
2.4 MENINGITES VIRAIS	28
2.5 EPIDEMIOLOGIA DOS ENTEROVÍRUS E PARECHOVÍRUS	30
2.5.2 Epidemiologia dos enterovírus no Estado do Paraná	38
2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	40
2.6.1 Características celulares e bioquímicas do LCR	40
2.6.2 Diagnóstico laboratorial dos enterovírus e parechovírus	42
2.6.3 Caracterização molecular dos enterovírus e parechovírus humanos	48
2.7 FATORES INTERFERENTES NAS REAÇÕES DE PCR	50
2.7.1 Tempo de coleta	50
2.7.2 Presença de substâncias interferentes	50
2.7.3 Contaminação por aerossóis	51
2.7.4 Interpretação dos resultados	51
2.8 OUTROS VÍRUS CAUSADORES DE MENINGITES	52
3 MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1 CASUÍSTICA	56
3.1.1 Grupo de estudo	57
3.1.2 Características celulares e bioquímicas do LCR	59
3.1.3 Métodos moleculares	60
3.1.4 PCR em tempo real	66
3.2 ENSAIO DE INFECTIVIDADE	68
3.3 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO	69
3.3.1 Metodologia	69
3.3.2 Filogenia	70

3.4 GEOPROCESSAMENTO.....	71
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
4 RESULTADOS.....	73
4.1 PACIENTES	73
4.2 CARACTERÍSTICAS CELULARES E BIOQUÍMICAS do LCR	76
4.2.1 Pacientes negativos	76
4.2.2 Pacientes positivos.....	76
4.3 OCORRÊNCIA DE CASOS POSITIVOS PARA EV/HPEV EM RELAÇÃO À TEMPERATURA MÉDIA MENSAL E ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO	78
4.4 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE LCR POR RT- PCR	78
4.5 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE LCR POR PCR EM TEMPO REAL.....	79
4.5.1 Concordância entre as metodologias de RT-PCR e PCR em tempo real	82
4.5.2 Características operacionais do RT-PCR.....	82
4.5.3 Características operacionais da metodologia de PCR em tempo real.....	83
4.6 ENSAIO DE INFECTIVIDADE	83
4.7 TIPAGEM DOS ENTEROVÍRUS E PARECHOVÍRUS POR SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	85
4.7.1 Classificação Molecular dos Enterovírus.....	85
4.7.3 Classificação molecular do parechovírus	93
4.8 RESULTADOS DE PCR ASSOCIADOS AOS FATORES INIBITÓRIOS	95
4.9 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS CASOS DE MENINGITES NOTIFICADOS NO ANO DE 2006 EM CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA	98
5 DISCUSSÃO	100
5.1 CARACTERÍSTICAS CELULARES E BIOQUÍMICAS DO LCR	101
5.2 OCORRÊNCIA DE CASOS POSITIVOS EM RELAÇÃO À TEMPERATURA MÉDIA MENSAL E ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO.....	102
5.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR RT-PCR.....	103
5.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE LCR POR PCR em tempo real.....	106
5.5 TIPAGEM DOS ENTEROVÍRUS E PARECHOVIUS HUMANOS POR SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	108
5.6 RESULTADOS DE PCR ASSOCIADOS AOS FATORES INIBITÓRIOS	110
5.7 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS CASOS DE MENINGITES NOTIFICADOS NO ANO DE 2006 EM CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA	112

REFERÊNCIAS.....	115
ANEXO 1 - CARTA COMISSÃO DE ÉTICA.....	130
ANEXO 2 - FICHA EPIDEMIOLÓGICA	131
ANEXO 3 - PONTUAÇÃO PARA MENINGITES BACTERIANAS CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO PARA MENINGITES VIRAIS	132
APÊNDICE 1 - PROTOCOLOS PCR.....	133
APÊNDICE 2 - TABELA DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	2
APÊNDICE 3 - TABELA DOS DADOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	135
APÊNDICE 5 - ARTIGO PUBLICADO.....	136

1 INTRODUÇÃO

As meningites se caracterizam por inflamação das meninges, membranas que recobrem o encéfalo e a medula. A síndrome pode ser causada por bactérias, fungos, parasitas ou vírus, sendo as meningites virais as infecções mais comuns do SNC. Os enterovírus (EV) são responsáveis por uma grande diversidade de manifestações clínicas, sendo frequentes as infecções do sistema nervoso central (SNC) que causam, na maioria das vezes, síndromes como as meningites, as encefalites e a paralisia flácida aguda (PFA) comumente conhecida como poliomielite. As meningites por EV não poliovírus são, usualmente, benignas e, geralmente, ocorrem em surtos epidêmicos nos meses do verão e outono nos países de clima temperado. As encefalites são raras, mas podem ocorrer, causando sequelas neurológicas a longo termo. A poliomielite é rara; na Europa foram registrados 84 casos da doença por EV não poliovírus em 2005, devido à vigilância da poliomielite (MIRAND *et al.*, 2009).

Nos EUA, os EV são responsáveis anualmente por 30.000 a 50.000 hospitalizações por meningite viral (OBERSTE *et al.*, 1999 a). Durante o período de 1970 a 2005, um total de 52.812 detecções Prevention de EV não poliovírus foram relatadas pelo “Center for Disease Control and Prevention” (CDC), sendo encontrados em 83,5% das detecções (KHETSURIANI *et al.*, 2006).

Os EV humanos compreendem mais de 100 tipos, classificados em quatro espécies, de A a D (KNOWLES *et al.*, 2011). Quase todos os sorotipos podem causar meningites, sendo alguns mais frequentemente relatados nos surtos epidêmicos, como o echovirus 30 e 13 ou o EV71, que está associado à incidência de infecções graves do SNC (OBERSTE *et al.*, 1999 b).

Os métodos convencionais para o diagnóstico virológico dessas infecções compreendem o isolamento em cultivo celular, a partir das amostras clínicas, e a evidência sorológica do aumento de quatro vezes ou mais dos títulos de anticorpos específicos no soro, entre a fase aguda e de convalescência. No entanto, a sensibilidade desses métodos é baixa e a grande maioria dos casos é considerada como infecção viral, sem a identificação do agente etiológico (TAKAMI *et al.*, 2003). Recentemente, tem sido descrita a grande sensibilidade e especificidade da técnica de transcrição reversa em amostras clínicas, seguida da reação em cadeia da

polimerase (RT-PCR) – em relação ao isolamento em cultivo celular (POZO *et al.*, 1998; RAMERS *et al.*, 2000; MICHOS *et al.*, 2007). A prática cotidiana do diagnóstico molecular dos EV baseia-se na amplificação do fragmento 5' NC do genoma viral a partir de amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR). Devido à padronização, automatização das técnicas de biologia molecular e rapidez do diagnóstico, a técnica de cultivo celular, que é exaustiva e demorada, está sendo substituída, permitindo um diagnóstico mais efetivo (PEIGUE-LAFEUILLE *et al.*, 2006). Para a tipagem dos EV, sequencia-se a região VP1, que é altamente variável, sendo de interesse nas infecções graves e infecções crônicas nos imunocomprometidos. Também, apresenta uma importância epidemiológica para distinguir os poliovírus dos EV não poliovírus, no contexto de um alerta sanitário para definir o tipo de EV responsável por uma epidemia de grande amplitude ou de uma manifestação clínica particular (BAILLY *et al.*, 2008).

Os parechovírus humanos (HPeV) foram isolados em 1950 e, inicialmente, classificados como echovirus 22 e 23. Análises realizadas por sequenciamento genômico justificaram a reclassificação desses agentes em um novo gênero da família *Picornaviridae* (STANWAY; KALKKINEN; ROIVAINEN, 1994). Publicações recentes mostram que os HPeV apresentam padrões epidemiológicos e clínicos muito similares aos EV (LUKASHEV, 2010). A prevalência e a diversidade genética dos HPeV foram demonstradas há pouco tempo sendo altamente prevalentes em humanos, com uma proporção de soropositividade de aproximadamente 88% em crianças de 2 anos de idade (ABED *et al.*, 2007).

Devido à escassez de dados referentes à etiologia das meningites virais no Estado do Paraná, bem como, a ausência de um protocolo de diagnóstico laboratorial para a pesquisa dos agentes virais, alguns objetivos foram propostos.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar por meio de métodos moleculares os EV humanos e HPeV em amostras de LCR obtidas de pacientes com suspeita clínica de meningite viral no Município de Curitiba e Região Metropolitana, no período de julho de 2005 a dezembro de 2006.

Objetivos específicos

- a) Padronizar a detecção dos EV humanos e HPeV em amostras de LCR de pacientes com suspeita clínica de meningite viral por meio da metodologia de RT-PCR.
- b) Validar a detecção de EV humano em amostras de LCR de pacientes com suspeita clínica de meningite por meio da metodologia PCR em tempo real.
- c) Comparar os resultados obtidos entre as metodologias de RT-PCR e PCR em tempo real
- d) Avaliar as características operacionais das metodologias de RT-PCR e PCR em tempo real.
- e) Realizar o sequenciamento genômico para detecção dos diferentes tipos de EV e HPeV nas amostras positivas por RT-PCR, comparando-as com os vírus caracterizados em outras regiões.
- f) Realizar o estudo clínico-epidemiológico e avaliar a prevalência das meningites virais no Município de Curitiba e Região Metropolitana no período de julho de 2005 a dezembro de 2006.

1.2 JUSTIFICATIVA

As meningites são facilmente transmitidas por contato direto com secreções respiratórias, caracterizando surtos epidêmicos. A ocorrência das meningites faz parte do sistema de notificação obrigatória nos sistemas de saúde. Desde que

inúmeros agentes etiológicos podem estar envolvidos na origem das meningites, a vigilância epidemiológica é fundamental para identificar, classificar e analisar a distribuição dos casos, bem como o comportamento do agente causal e seu impacto na saúde populacional.

De acordo com relatos da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Paraná (SESA-PR), em dados compilados no período de 1996 a 2010, uma média de 707 casos de meningites de todas as etiologias é notificada anualmente (PARANÁ, 2011). Estima-se que, aproximadamente, 54% dos casos são de meningite de causa viral, 14% não especificadas e 32% de outras causas (PARANÁ, 2011). Atualmente, no Paraná, há escassez de dados referentes à etiologia das meningites virais, que provavelmente são subestimadas, bem como é necessário o estabelecimento de um protocolo diagnóstico que possibilite resultado rápido e sensível (BRASIL, 2007).

Santos *et al.* (2006) relataram a frequência das meningites por EV no Brasil. No período do estudo, detectou-se genoma do EV em 15% das amostras. Os autores ressaltaram a importância de avaliar fatores epidemiológicos responsáveis pela frequência das meningites virais, elucidar as relações filogenéticas entre outras cepas no Brasil, assim como modos de transmissão e circulação das enteroviroses.

Adicionalmente, de acordo com dados dos EUA, as meningites por EV são as mais comuns, resultando em custos diretos totais, na ocasião dos episódios de meningite por EV, de aproximadamente US\$ 450,00 para pacientes ambulatoriais e US\$ 5.093,00 para pacientes internados. No mesmo estudo, relatou-se que intervenções como um diagnóstico rápido, diminuição no tempo ou mesmo a avaliação da real necessidade de hospitalização poderão afetar significativamente os custos no manejo da meningite por enterovírus (CHADWICK & LEVER, 2000).

No Brasil, no Estado da Bahia, os HPeV foram relatados em amostras de fezes de pacientes com diarreia aguda, provavelmente os únicos dados referentes ao vírus até agora no país (DREXLER *et al.*, 2009). Nesse contexto, estudos prospectivos são importantes para o levantamento de dados que analisem o impacto dessas infecções em nossa região.

O estudo tem como objetivo elucidar a etiologia das meningites virais por meio da validação e padronização de técnicas de biologia molecular. Bem como, levantar dados clínico-epidemiológicos dos pacientes com suspeita clínica de meningite viral.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CLASSIFICAÇÕES DOS ENTEROVÍRUS E PARECHOVÍRUS

Os EV e HPeV pertencem à família *Picornaviridae*, considerada uma das maiores e mais importantes famílias do ponto de vista humano e agropecuário. Ela contém importantes patógenos, como o poliovírus, vírus da hepatite A, vírus da febre aftosa, entre outros, que abrangem grupos de vírus que induzem efeitos patogênicos em seres humanos e em animais. Caracteristicamente, a família *Picornaviridae* é composta pelos menores vírus conhecidos (pico = muito pequeno), cujo ácido nucléico é o RNA de polaridade positiva. Essa família tem grande importância no âmbito médico e econômico, pois teve um papel proeminente no desenvolvimento da virologia moderna. A síndrome viral “mão, pé, boca” foi o primeiro vírus animal descrito por Loeffler e Frosch, em 1898 (RACANIELLO, 2005). Dez anos depois, em 1908, relatou-se a comprovação de a poliomielite ser uma doença viral (HUBINGER; LIBERTO, 1994). Quarenta anos depois, estudos sobre o ciclo replicativo dos poliovírus foram iniciados e padronizou-se o ensaio de placa, essencial para a quantificação da infectividade viral (RACANIELLO, 2005).

A família está dividida em seis gêneros: enterovírus, hepatovirus, rinovirus, cardiovirus, aftovirus e parechovírus. As enteroviroses humanas foram originalmente classificadas em quatro categorias, baseadas no desenvolvimento de doenças humanas, virulência e a patogênese após inoculação intracraniana em camundongos: (1) poliovírus (PV), agente da poliomielite humana, geralmente não patogênico em camundongos; (2) vírus coxsackie A (CAV) associado às doenças humanas do sistema nervoso central, exantema e herpangina, que causam paraparesia espástica em camundongos; (3) vírus coxsackie B (CBV) associado à doença humana do sistema nervoso central e doença cardíaca, causa paraparesia espástica em camundongos; (4) echovirose (ECHO), na época não foi relacionado com doença e não foi patogênico em animais. Posteriormente, evidenciou-se que essa classificação era insuficiente para descrever o universo de enteroviroses humanas, isso porque viroses que eram patogênicas em camundongos, antigenicamente idênticas aos echovirus já conhecidos, foram isoladas e associadas a um grande número de doenças humanas. Além disso, novos sorotipos de EV

humanos foram periodicamente sendo isolados, denominados como enterovírus e numerados sequencialmente a partir do EV68 (MELNICK *et al.*, 1974).

Durante a caracterização inicial dos EV no início dos anos 50 do século XX, cepas individuais eram classificadas como “coxsackie A” ou “coxsackie B”, de acordo com a patogênese observada, após inoculações intracraniais em camundongos recém-nascidos. Mais tarde, cepas eram caracterizadas em sorotipos por fixação de complemento cruzada ou neutralização cruzada, utilizando-se antisoro contra cepas específicas (DALLDORF; SICKLES, 1956).

A classificação atual está baseada nas propriedades biológicas e moleculares dos vírus e os EV humanos estão divididos em quatro espécies: (1) Enterovírus humano A (HEV-A) (CAV2 ao CAV8, CAV10, CAV12, CAV14, CAV16 e EV71); (2) Enterovírus humano B (HEV-B) (CAV9, CBV1, ao CBV6, E1 ao E7, E9, E11 ao E21, E24 ao E27, E29 ao E33, EV69, e EV73 proposto); (3) Enterovírus humano C (HEV-C) (CAV1, CAV11, CAV13, CAV15, CAV17 ao CAV22 e CAV24); (4) HEV-D (EV68 e EV70) (quadro 1) (KING *et al.*, 2000). Os EV humanos pertencem à família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*, e compreendem mais de 114 sorotipos diferentes. São assim denominados por serem vírus que se replicam no trato gastrointestinal, sendo eliminados para o meio ambiente através do material fecal (PALLANSCH & ROOS, 2007).

QUADRO 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS ENTEROVÍRUS.

TAXONOMIA TRADICIONAL	TAXONOMIA ATUAL
Poliovirose PV1-3	Enterovírus humano A (HEV-A) CAV2-8, 10, 12, 14, 16; EV71, EV76, EV89, EV90, EV91
Vírus coxsackie A CAV1-A22, A24	Enterovírus humano B (HEV-B) CAV9, CBV1-6; E1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33, EV69, EV73-75, EV77-8, EV79-88, EV100-101
Vírus coxsackie B CBV1-6	Enterovírus humano C (HEV-C) CAV1, 11, 13, 17, 19-22, 24, PV1-3
Echovirose E1-7, 9, 11-21, 24-27, 29-33	Enterovírus humano D (HEV-D) EV68, 70
Outros Enterovírus de humanos 68-71	

FONTE: adaptado de King *et al.* (2000) e Khetsuriani *et al.* (2006).

Recentemente, alguns vírus previamente classificados como EV, denominados echovirus 22 e 23, foram reclassificados como parechovírus humano (HPeV), um diferente gênero da família *Picornaviridae* (VILLARRUEL *et al.*, 2010).

O gênero *parechovirus* já possui dezesseis sorotipos descritos: HPeV tipos 1- 16 (ITO *et al.*, 2004; BENSCHOP *et al.*, 2006; AL-SUNAJDI *et al.*, 2007; WATANABE *et al.*, 2007, *PICORNAVIRIDAE*, Grupo de estudo, 2011).

2.2 ORGANIZAÇÃO GENÔMICA E CICLO REPLICATIVO DOS PICORNAVÍRUS

O genoma dos picornavírus tem aproximadamente 7,4 a 7,5 Kb (figura 1) e é constituído de RNA poliadenilado de polaridade positiva, com uma sequência de 22 aminoácidos que codificam a proteína (VPg) covalentemente ligada à região terminal 5'. Apresenta um longo quadro aberto de leitura (ORF), flanqueado por regiões terminais não codificadoras (NCRs) 5' – 3', e codifica uma poliproteína de aproximadamente 2.200 aminoácidos que é processada por proteinases virais para elaboração de polipeptídeos virais maduros. A região P1 codifica as proteínas do capsídeo 1A a 1D (cadeias dos quatro polipeptídeos VP₁, VP₂, VP₃ e VP₄). Esses têm como funções: proteger o RNA genômico viral das nucleases do citoplasma da célula hospedeira; reconhecer receptores específicos na membrana plasmática da célula hospedeira; selecionar e organizar o genoma viral. O capsídeo é o elemento efetivo na penetração da membrana plasmática e na liberação do RNA genômico no citoplasma das células hospedeiras permissivas (CASAS *et al.*, 1997; MUIR *et al.*, 1998; PALACIOS *et al.*, 2002; BROWN *et al.*, 2003; RACANIELLO, 2005). O RNA viral é traduzido sob a forma de uma poliproteína (P1) que, posteriormente, é clivada dando origem a vários produtos, entre os quais as quatro proteínas estruturais VP₁, VP₂, VP₃, VP₄ (HUBINGER; LIBERTO, 1994). A região P2 codifica a protease, 2A^{pro} e duas proteínas envolvidas na replicação do RNA, 2B e 2C. A VPg (3B) e seu precursor (3AB), a maior protease viral (3C^{pro}), e a RNA polimerase-RNA dependente (3D^{pol}) são codificadas na região P3 (BROWN *et al.*, 2003).

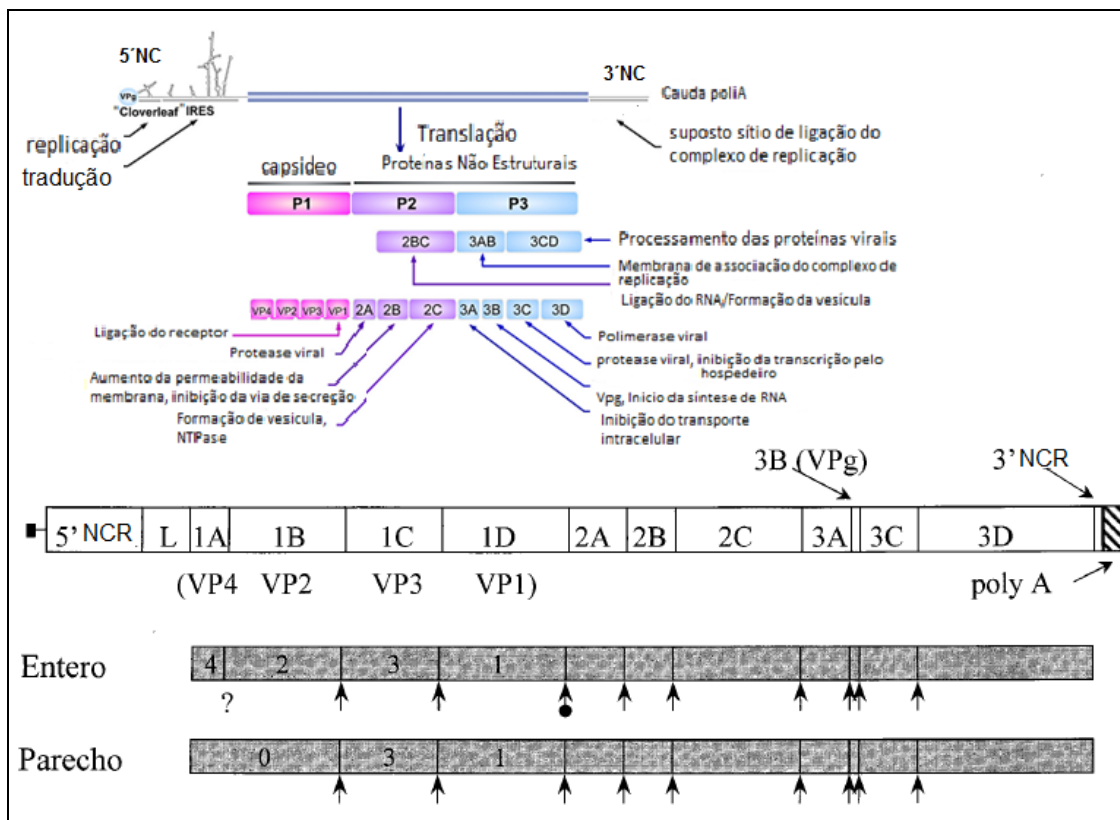


FIGURA 1 – GENOMA DOS PICORNAVÍRUS E MAPA ESQUEMÁTICO DOS GÊNEROS ENTEROVÍRUS E PARECHOVÍRUS HUMANOS. PRODUTO DAS POLIPROTEÍNAS E SUAS FUNÇÕES.

FONTE: adaptado de Lin *et al.* (2008) e Stanway e Hyypiä, (1999).

NOTA: Sítios de clivagem das proteinases para o processamento das proteínas estão indicados pelas flechas verticais. Flechas verticais com círculo representam sítios da atividade da tripsina. O sítio de clivagem da VP0 por mecanismo ainda desconhecido, possivelmente autocatalítico, está indicado por ?

Todo o processo de biossíntese dos picornavírus é desenvolvido no citoplasma da célula hospedeira (figura 2), que se inicia pela adsorção do virion às unidades receptoras específicas, localizadas na membrana plasmática. Os receptores intervêm, por um processo ainda desconhecido, na perda de VP₄, saída do RNA viral do capsídeo e sua liberação no citoplasma. A fita de RNA, nos ribossomos da célula hospedeira, forma polirribossomos, induzindo à síntese de uma poliproteína. Por meio da clivagem proteolítica, ocorre a formação do precursor da proteína do capsídeo (P₁) e outras proteínas (P₂ + P₃).

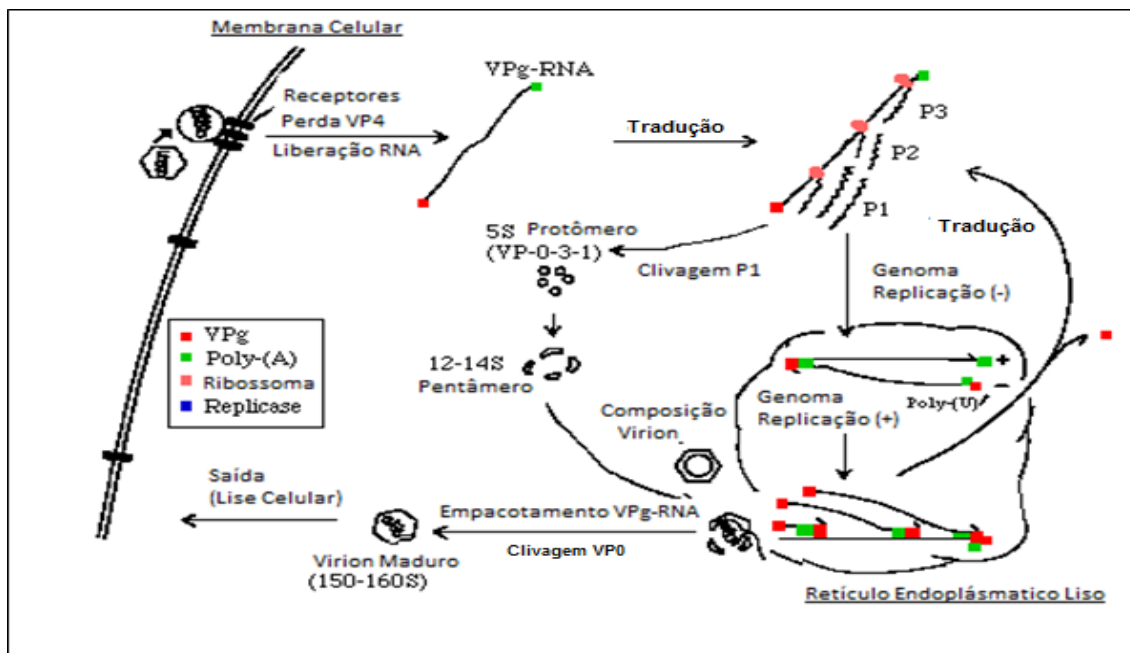


FIGURA 2 – CICLO REPLICATIVO DOS ENTEROVÍRUS.

FONTE: adaptado de Microbiology Bytes (2007).

A proteína P₃ é clivada autocataliticamente, originando três proteínas menores que são: a proteinase 3C, necessária para a clivagem das proteínas virais; uma proteína 3AB, que vai originar VP_g e, provavelmente, é necessária para iniciar a síntese de RNAs; uma RNA polimerase 3D, importante para copiar a fita positiva de RNA (RNA⁺) e formar o RNA complementar negativo, com poli (U) no terminal 5'. Nova síntese de RNA⁺ leva à formação da forma replicativa intermediária (RI), que está associada ao retículo endoplasmático liso e gera um “pool” de RNA⁺ para tradução, enquanto alguns servirão de molde para a síntese adicional de RNA fita negativa. Com o aumento da concentração de proteínas, uma quantidade crescente de RNA⁺ é reunida em virions. As partículas completas de vírus, que muitas vezes formam cristais nas células infectadas, são finalmente liberadas pela desintegração da célula hospedeira. O tempo necessário para que se complete o ciclo replicativo, desde a infecção até a formação do virion maduro, geralmente varia de cinco a dez horas, tempo dependente de variáveis como pH, temperatura, vigor nutricional da célula hospedeira e o número de partículas que infectam a célula. Em condições ótimas poderá ocorrer a biossíntese de 25.000 a 100.000 partículas de picornavírus por célula (HUBINGER & LIBERTO, 1994; PALLANSCH & ROSS, 2005).

Os HPeV apresentam similaridades com os EV e diferem em algumas características que foram determinadas por sequenciamento genômico. Essas determinações indicaram que o genoma do HPeV tem uma disposição das porções dos genes similares aos dos EV, porém, constituem uma entidade molecular separada, principalmente por apresentarem divergências das regiões P1 de 22% e VP1 de 32% (STANWAY & HYIPIÀ, 1999).

2.3 PATOGÊNESE DOS PICORNAVÍRUS

EV foram isolados de humanos, tendo como sítio de replicação primária o trato gastrointestinal, resultando em uma infecção inaparente ou moderada com sinais e sintomas gastrointestinais. No entanto, em uma grande proporção dos casos ocorre uma disseminação do vírus para outros órgãos, levando a doenças graves, as quais apresentam características relacionadas aos diferentes tipos de EV (MINOR; MORGAN-CAPNER, MUIR, 2000). O protótipo para o estudo da patogênese dos picornavírus são os poliovírus. O sítio de entrada é via oral e presume-se que os mecanismos adotados para os poliovirus são os mesmos para os não poliovirus. No entanto, alguns EV apresentam outras rotas de infecção, por exemplo, o vírus coxsackie A21, um dos causadores de doença respiratória, é transmitido pela via respiratória; o EV71 pode causar conjuntivite hemorrágica e é transmitido por via respiratória, secreção ocular ou pelo uso indireto de utensílios contaminados. Na maioria dos casos, a via de transmissão é a fecal oral, sendo a eliminação e transmissão do vírus muito eficientes, caracteristicamente, podem ocorrer durante um longo período, algumas vezes por mais de seis semanas. O poliovírus se multiplica inicialmente na mucosa, especificamente nas amígdalas e placas de Peyer, a replicação nesses sítios é detectada dentro de um a três dias. Posteriormente, o vírus se multiplica nos linfonodos cervicais e mesentéricos, levando à viremia, com subsequente invasão dos tecidos do endotélio, incluindo os linfonodos, medula óssea. Nesse estágio, o SNC pode ser invadido após viremia maior, fase em que, se houver um controle da infecção, o indivíduo será assintomático (figura 3) (HUBINGER & LIBERTO, 1994; PALLANSCH & ROSS, 2007).

A infecção da célula pelo EV é um evento produtivo e eficiente. Para completar o ciclo o vírus e proteínas virais são envolvidos na replicação viral e tradução, alterando as funções do hospedeiro, como expressão de genes celulares, localização de proteínas e tradução de sinais. Tipicamente, poucos sorotipos causam infecções em uma comunidade, durante certo período do ano e, ainda, alguns sorotipos são causadores de doenças e outros não. Os EV podem infectar todos os tecidos corporais. Alguns têm tropismo para certos órgãos, como coxsackie B que infecta o tecido cardíaco e EV71 que infecta o tecido do SNC. No entanto, esse tropismo não é único e nem específico. Infecção por um mesmo sorotipo pode apresentar clínica diferenciada e vários sorotipos diferentes podem apresentar a mesma síndrome clínica (SAWYER, 2002).

Os HPeV podem estar relacionados com distintas formas de infecção aguda, podendo ter caráter sistêmico, podendo afetar os sistemas gastrointestinal, respiratório e do SNC em neonatos e crianças jovens. Porém, poucas informações estão disponíveis sobre esse gênero (HARVALA *et al.*, 2009).

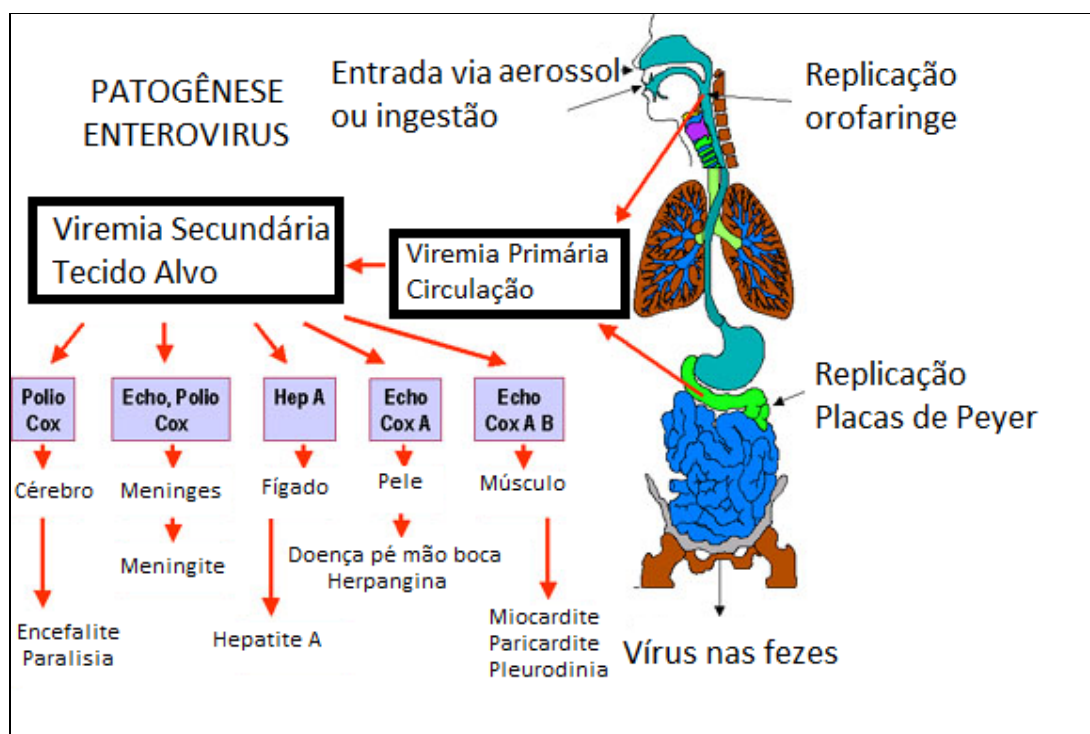


FIGURA 3 – PATOGÊNESE DOS ENTEROVÍRUS.
FONTE: adaptado de Microbiology Bytes (2007).

2.4 MENINGITES VIRAIS

O cérebro pode ser considerado um órgão privilegiado imunologicamente. Desprovido de sistema linfático, com raras células imunocompetentes trafegando pelo seu parênquima e com apenas 0,5% da quantidade de anticorpos presentes no soro, o SNC poderia ser alvo fácil das infecções virais (ALMEIDA, 1999). Muitos vírus, quando inoculados diretamente no parênquima nervoso, se replicam com facilidade, sendo a infecção resultante usualmente grave. O mesmo não ocorre quando essa se dá em órgãos extraneurais, como exemplo tem-se a infecção pelo vírus herpes simplex que, quando inoculado no tegumento cutâneo, provoca apenas pequenas vesículas, habitualmente sem maiores consequências, ao passo que a sua inoculação no cérebro ocasiona uma gravíssima encefalite necrosante. Apesar de potencialmente vulnerável, a maioria das infecções virais sistêmicas não envolve o sistema nervoso, pois a presença da barreira hematoencefálica (BHE) confere um significativo grau de proteção física à exposição viral, associada à grande eficácia do sistema imunológico em eliminar partículas virais em circulação (ARAÚJO, 2007). Os capilares do SNC apresentam características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas diferenciadas e que se combinam para formar a BHE. Diferentes fatores podem levar a quebra da BHE, com consequente aumento da permeabilidade dos capilares do SNC, ocasionando a passagem de macromoléculas, aumento do fluxo transendotelial e do transporte vesicular por meio das células endoteliais. O LCR tem baixa concentração de proteínas, bem como de células, as quais podem cruzar a BHE através de moléculas de adesão específicas expressas nas células endoteliais. Linfócitos ativados cruzam livremente a BHE, independente da especificidade antigênica. Assim, inicia-se o processo inflamatório com liberação de citocinas e alteração da zona de oclusão, permitindo a passagem de células entre as células endoteliais (TSACOPOULUS & MAGISTRETTI, 1996; ALMEIDA, 1999).

As infecções do SNC são classificadas como meningites ou encefalites. A meningite é a síndrome infecciosa mais frequente do SNC e caracteriza-se pela inflamação das leptomeninges, apresentando um curso clínico limitado e com completo restabelecimento em sete a dez dias (VOKSHOOR, 2007; ALMEIDA, 2007). O termo meningite asséptica é comumente utilizado como um termo geral para todos os tipos de meningites sem desenvolvimento de bactérias em cultura após semeadura de LCR (LEE & DAVIES, 2007) e está relacionado com uma

síndrome clínica de inflamação das meninges, com predominância de linfócitos no LCR. Muitos autores consideram os termos meningite asséptica e meningite virais, como sinônimos, porém, meningite linfocítica parece ser mais apropriada (ALMEIDA *et al.*, 2007; LEE & DAVIES, 2007).

O diagnóstico clínico das meningites virais é difícil, especialmente em crianças, em que os parâmetros diferenciais do LCR são menos discriminativos que nos adultos. Adicionalmente, as alterações do SNC infectado por vírus são diversas, e os sinais e sintomas clínicos são, frequentemente, indistinguíveis dos de sepsis, meningite bacteriana e outras infecções virais (WILDIN & CHONMAITREE, 1987). As meningites virais ocorrem no mundo inteiro, são as síndromes mais frequentes do SNC e são, usualmente, benignas e autolimitadas, sendo que 95% das crianças acometidas evoluem para a cura. Os sinais clínicos comuns na fase aguda da síndrome incluem febre e cefaléia, seguidas de rigidez de nuca em 75% dos pacientes; convulsões são raras. Em menor proporção, pode ocorrer náusea, vômito, irritabilidade, letargia e falta de apetite em neonatos (LEWIS & GIBBON, 2000; WILDIN & CHONMAITREE, 1987). Neonatos com infecções no SNC não apresentam sinais específicos e febre. Rigidez de nuca não está presente e EV podem ser evidenciados no LCR mesmo na ausência de pleocitose (SAWYER, 2002).

As meningites por EV geralmente são benignas, exceto em crianças menores de 2 anos de idade, nas quais as taxas de morbidade e mortalidade são significantes (ROMERO & NEWLAND, 2003). Surtos acontecem comumente durante o verão e outono, no entanto, em várias comunidades casos esporádicos podem ocorrer ao longo do ano (CHADWICK, 2006).

Os HPeV tipos 1 e 2, previamente denominados echovirus 22 e 23, respectivamente, foram inicialmente isolados de crianças com sintomas gastrointestinais e respiratórios, em 1956, bem como de pacientes assintomáticos (STANWAY; JOKI-KORPELA; HYYPIÄ, 2000). Desde 2004 outros tipos virais foram descobertos e aproximadamente 16 tipos estão descritos (KIM *et al.*, 2010). O HPeV3 foi descrito no Japão em 2004 e relacionado com doenças graves, especialmente sepsis, meningites e encefalites em crianças nos primeiros meses de vida, embora o vírus já tenha sido descrito em outros tipos de infecção (HARVALA, 2009).

2.5 EPIDEMIOLOGIA DOS ENTEROVÍRUS E PARECHOVÍRUS

As enteroviroses humanas são distribuídas mundialmente e causam um largo espectro de doenças, desde síndromes febris até doenças severas, como meningites linfocitárias, encefalites, poliomielite, miocardite e sepsis neonatal. Elas podem estar relacionadas com o desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes tipo 1 e cardiomiopatia dilatada (KHETSURIANI *et al.*, 2006). Em climas temperados, a infecção ocorre especialmente nas estações de verão e início do outono (ROMERO & NEWLAND, 2003). O vírus é eliminado pelo trato respiratório superior durante uma a três semanas e nas fezes por oito semanas. A rota fecal-oral é o modo de transmissão predominante, porém, algumas exceções podem ocorrer, como no caso do vírus coxsackie A21, que é transmitido principalmente por secreções respiratórias, e o EV70, transmitido pelas lágrimas e espalhado pelas mãos e fômites (SAWYER, 2002).

Uma das mais distintas doenças causadas pelos EV é a poliomielite, causada pelos poliovírus, os quais foram os primeiros vírus a serem descritos e incluem três sorotipos: poliovírus tipos 1, 2 e 3; e com o desenvolvimento das vacinas inativada (SALK, 1953) e atenuada (SABIN, 1955), a doença já foi erradicada em várias regiões do mundo (CHADWICK, 2006). Em pacientes com comprometimento da imunidade humoral, a infecção por EV pode resultar em meningoencefalite crônica, originalmente descrita em pacientes com agamaglobulinemia e designada por “chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemia” (CEMA) (ROMERO & NEWLAND, 2003).

Estima-se que 5 a 10 milhões de infecções por EV aconteçam nos EUA a cada ano. A maioria das infecções é branda ou assintomática e, como resultado, as enteroviroses são consideradas patógenos humanos menos importantes. No entanto, as infecções por EV podem resultar em doença grave ou até fatal, sendo crianças e pacientes imunocomprometidos alvos de complicações. Infecções congênitas podem ocorrer, porém, sua frequência ainda não está estabelecida, há relatos de que esses agentes podem causar ou contribuir para o desenvolvimento de doenças crônicas, incluindo cardiomiopatias (MUIR *et al.*, 1998).

A mais comum e potencialmente grave doença causada por EV é a meningite, com mais de 10.000 casos anuais oficialmente reportados pelo CDC.

Estima-se que a maioria dos casos não são notificados e que pelo menos 75.000 casos ocorram a cada ano nos EUA (SAWYER, 2002).

O CDC reporta a detecção dos EV não poliovírus e HPeV durante o período de 2006 a 2008, em diferentes tipos de amostras, baseado nos resultados de dois sistemas de vigilância nos EUA, o Sistema de Vigilância Nacional de Enterovírus dos EUA (NESS) e Sistema Nacional de Vigilância de Vírus Respiratórios e Entéricos (NREVSS). No período do estudo, aproximadamente 70% das detecções, ocorreram durante julho-outubro, pico da estação de circulação dos EV. Os sorotipos mais encontrados foram o coxsackie B1, echovirus 6, 9 e 18 e coxsackie A9 em um total de 1.632 amostras positivas foram notificadas, a idade dos pacientes foi de < 1 mês – 79 anos, com mediana de dois anos. O LCR foi a amostra mais comum (51%) (VILLARRUEL *et al.*, 2010).

Relata-se que 85% dos casos de meningites virais têm como agente etiológico os EV e vírus herpes simplex e raramente, outros vírus como o adenovírus. Uma grande proporção de americanos apresentam meningites virais a cada ano, que podem afetar indivíduos de ambos os sexos e se caracterizam por surtos anuais no verão ou primavera. A mortalidade associada a essas infecções é menor que 1%. (BERLIN *et al.*, 1993; MUIR *et al.*, 1998; CHADWICK & LEVER, 2000; RAMERS *et al.*, 2000; VOKSHOOR, 2007).

Vários autores têm ressaltado a importância do diagnóstico laboratorial e seu impacto no manejo clínico de pacientes com meningite viral. Estudos iniciais demonstravam a utilização do cultivo celular. Em 1987 observou-se que 71% de amostras de LCR positivas foram evidenciadas por cultivo celular e utilizando-se a pleocitose no LCR como método de seleção. Oitenta e um por cento dos pacientes apresentaram idades <1 ano. O surto ocorreu com definição dos sorotipos echovirus 9 e 11 por meio da metodologia de soroneutralização (WILDIN & CHONMAITREE, 1987). Em 1993, nos EUA, por meio da metodologia de cultivo celular e inoculação em animais, utilizou-se amostras de LCR coletadas de crianças com idades <2 anos, observou-se que 62% das amostras eram positivas para EV e que a maioria delas foi coletada nos meses com temperaturas mais elevadas, reforçando o padrão sazonal dos EV (BERLIN *et al.*, 1993).

Confirmou-se por meio de metodologia de biologia molecular um surto de meningite asséptica por EV que acometeu crianças <1 ano (25%) e crianças <10 anos (60%) em San Diego, onde o número de amostras coletadas no período do

surto foi quatro vezes maior que nos últimos 5 anos antecedendo o período do estudo (SAWYER *et al.*, 1994).

Em um laboratório de diagnóstico virológico no Reino Unido, foram examinadas amostras de LCR por meio da metodologia de “nested” PCR, o DNA/RNA viral foi detectado em 6,6% das amostras e os vírus mais comuns foram os EV (54%). Febre, meningismo, erupção cutânea e contagem de leucócitos $\geq 5/\text{mL}$ foram os dados com significância estatística (JEFFERY *et al.*, 1997). Um estudo prospectivo de EV e herpesvírus foi realizado na Espanha. Coletou-se LCR de pacientes hospitalizados com suspeita de infecção viral, nos quais, 55/200 pacientes imunocompetentes (35%) apresentaram resultados positivos para EV e 41% dos pacientes imunocomprometidos tiveram resultados positivos somente para os herpesvírus (CASAS *et al.*, 1999).

Vários estudos foram realizados na Espanha demonstrando o envolvimento dos EV. Em um período de 10 anos, 15.662 amostras clínicas de pacientes hospitalizados com doenças graves relacionadas aos EV foram analisadas. A maioria das amostras eram LCR, 28 tipos diferentes de EV foram detectados em 10% destas amostras. Os echovirus foram os mais frequentes, responsáveis por 90% das amostras tipadas, sendo os quatro sorotipos mais prevalentes o echovirus 30, o principal sorotipo associado a meningites; echovirus 9, agente etiológico de 20 surtos; echovirus 6, responsável por um surto no ano de 1997; e echovirus 4. Os vírus coxsackie A e B ocorreram em 7% das amostras (TRALLERO *et al.*, 2000). Echovirus tipo 13 foi relatado como agente do primeiro surto em crianças <13 anos, com maior incidência em crianças <1 ano na Espanha, no ano de 2000. Esse sorotipo não havia sido previamente detectado na Espanha, causando doença grave. Os autores ressaltam a importância da vigilância epidemiológica para o entendimento dos diferentes padrões da infecção por EV e sua associação com doenças (TRALLERO *et al.*, 2003).

Detectou-se enterovírus não pólio em 30 de 70 pacientes hospitalizados com sinais e sintomas de meningite asséptica, com idades entre 1 a 16 anos, apresentando dor de cabeça, vômito, febre e sinais de irritação meníngea. Não se observou diferenças demográficas ou clínicas em pacientes EV positivos ou negativos (BÖTTNER *et al.*, 2002).

Na Argentina, detectou-se um surto de meningite viral na Província de Tucumán, 58,6% das amostras apresentaram resultados positivos para enterovírus,

foram identificados os EV tipos 4 e 15. Observou-se que em 75,1% dos casos, entre crianças menores de nove anos 56% necessitaram de hospitalização (FREIRE *et al.*, 2003).

Detectou-se um surto de meningite por echovirus 30 em Roma no ano de 1997, em duas escolas. Identificaram-se fatores de risco associados à síndrome, caracterizando-se a transmissão de pessoa para pessoa, desde que houve coincidência quanto à proximidade geográfica, data do surto e não foi isolado EV das águas das piscinas frequentadas pelas crianças das duas escolas, reforçando a transmissão de pessoa para pessoa (FAUSTINI *et al.*, 2006).

Um sistema de vigilância nacional do EV tem monitorado a circulação das enteroviroses desde 1961 nos EUA. Durante um período de 30 anos aproximadamente 52.812 detecções de EV e HPeV foram reportadas ao sistema. Os sorotipos encontrados incluem ECHO 9, 11, 30 e 6 e vírus coxsackie B5. Crianças <1 ano foram a maioria e observou-se maior incidência de amostras positivas nas estações do verão e outono. A amostra mais utilizada foi o LCR, seguida de amostra respiratória e fecal. Óbito foi encontrado em 3,3%, sendo que as infecções por vírus coxsackie B4 e HPeV tipo 1 foram associadas a alto risco de óbito, enquanto ECHO 9 foi associado a baixo risco de óbito. Foram observados picos de hospitalização por meningite linfocitária, com echovirus 9 predominante. Depois da meningite asséptica, casos de hospitalização foram devidos às paralisias, encefalites e infecções severas em neonatos e indivíduos imunodeficientes. As apresentações clínicas reportadas foram meningite asséptica, meningoencefalite, erupção cutânea e doença gastrointestinal. Infecção em neonatos foi associadas à hepatite e pneumonia. HPeV tipos 1 e 2 foram reportados em menores proporções e associados às meningites assépticas, principalmente em surtos ocorridos no verão e outono (KHETSURIANI *et al.*, 2006).

Na Grécia, foi diagnosticada e determinada a frequência das meningites assépticas e encefalites causadas por herpesvírus e EV. Oitenta e um pacientes foram avaliados com idades maior ou igual a 15 anos. Baseados no padrão clínico e resultados laboratoriais, 36/81 pacientes apresentaram meningite. O EV foi o agente mais frequente, seguido do vírus da varicela zoster e herpes simplex (FRANTZIDOU *et al.*, 2008).

Detectou-se 4,9% de positividade para EV, em amostras de pacientes com meningite/encefalite, no estado de Nova York. Os sorotipos mais frequentes foram

coxsackie B5 e echovirus 18 e 6. A maioria dos pacientes apresentou cefaleia intensa e febre. A análise do LCR demonstrou níveis de proteína elevada (> 45 mG/dL) e leucocitose (> 5 células/mm³) (TAKAVOLI *et al.*, 2008).

Em Taiwan foram analisadas 8.916 amostras de diferentes sítios anatômicos por meio das metodologias de cultivo celular e neutralização para tipagem das amostras. Não foi possível, pela metodologia de neutralização, a tipagem de 10% das amostras, estas foram tipadas por meio do ensaio de RT-PCR e sequenciamento e observou-se 20 sorotipos diferentes de enterovírus, sendo o vírus coxsackie B o mais comum (LIN *et al.*, 2008).

Foram avaliados dados clínicos e epidemiológicos de um surto de meningite asséptica na França. Em 91% dos casos, o EV foi identificado como agente etiológico, sendo o sorotipo echovirus 30 o mais frequente. Estudos filogenéticos evidenciaram que ocorreu a cocirculação de linhagens distintas de echovirus 30, sugerindo que a diversidade genética pode ser um pré-requisito para a emergência de novas cepas de EV responsáveis por futuros surtos (BRUNEL *et al.*, 2008).

Na Grécia, a análise de um surto de meningite asséptica durante o verão revelou a presença de EV em aproximadamente 60% das amostras positivas, com predominância do sorotipo echovirus tipo 4 (LOGOTHETI *et al.*, 2009).

A doença “mão, pé, boca” tem grande incidência nos países asiáticos, especialmente na China. No ano de 2010, um grande surto da doença pé, mão, boca ocorreu em Guangxi, sul da China. Mais de 17.000 casos com 27 mortes foram relatados, sendo a maioria dos pacientes (90%) crianças com idades <5 anos. Foram analisadas amostras de fezes por PCR em tempo real, sendo, 76% positivas para EV71, as amostras negativas foram avaliadas, nas quais detectou-se echovirus 30 definindo uma cocirculação dos vírus, o que poderá levar a uma significativa taxa de morbidade e mortalidade e, ainda, a uma oportunidade de recombinação genética (HAN *et al.*, 2011).

Poucos estudos relatam a detecção dos HPeV em amostras de LCR para o diagnóstico viral. Estudos demonstram a incidência do vírus em amostras de LCR, principalmente em crianças com idades menores que dois meses. Na Espanha, HPeV foram encontrados em amostras de LCR em uma proporção de 3% na investigação de infecção do SNC (PIÑEIRO *et al.*, 2010). Esses relatos são similares aos encontrados em Edinburg entre os anos de 2006 e 2008, no qual o HPeV tipo 3 foi encontrado em 2,9% das amostras de LCR em crianças <2 anos (HARVALA,

2009). Outro estudo em Amsterdam relata o envolvimento de HPeV em 4,6% das amostras de LCR em crianças menores que dois anos no período de 2004-2006 (WOLTHERS *et al.*, 2009). Na Holanda, em um estudo de vigilância de enterovirose, no período de 2000 a 2007, HPeV foi encontrado em 12,2% das amostras não tipadas pelas metodologias tradicionais (VAN DER SANDEN *et al.*, 2008).

No estudo elaborado por Piñeiro *et al.* na Espanha, o tipo viral na maioria das amostras foi o HPeV tipo 3, que está comumente envolvido em infecções do SNC, de acordo com diferentes relatos (BOIVIN *et al.*, 2005; ADEB & BOIVIN, 2007; BENSCHOP *et al.*, 2006; VAN DER SANDEN *et al.*, 2008; HARVALA, 2009).

2.5.1 Epidemiologia dos Enterovírus e parechovírus no Brasil

Alguns estudos foram realizados no Brasil identificando surtos por EV, em vários estados. Analisou-se casos de meningites, no Rio de Janeiro, os quais foram identificados como casos não especificados, de acordo com os critérios preconizados pelo Ministério da Saúde/1975. Na época, a identificação dos vírus no LCR não era realizada de rotina, porém, um surto de meningite meningocócica ocorreu em 1977, apavorando a população, sendo priorizada a identificação dos vírus por meio da metodologia de cultivo celular, identificando-se nestas amostras o echovirus 9 (NERY-GUIMARÃES; BITTENCOURT; PASTOR, 1981).

Silva *et al.* (1990) relataram a primeira evidência da infecção por EV71. A pesquisa foi realizada por meio de soroneutralização com anticorpos contra os três sorotipos de poliovírus e contra a cepa BrCr do EV71. Observou-se a presença de anticorpos neutralizantes em 32,1% das amostras de quatro regiões geográficas distantes, indicando a disseminação do vírus no Brasil.

Uma epidemia de doença exantemática foi observada em São Paulo, em que se evidenciou o vírus coxsackie B3 isolado das fezes dos pacientes. Em 71% das crianças, contatos dos pacientes, observou-se presença de anticorpos para o vírus coxsackie B3 (MOREIRA *et al.*, 1995).

O papel do EV71 em pacientes com paralisia flácida aguda, depois da erradicação do poliovírus no Brasil, foi avaliado. Amostras de soro foram coletadas de crianças de várias regiões do Brasil, com suspeita de poliomielite e sintomas de

paralisia aguda flácida, 10% das amostras apresentaram anticorpos IgM para EV71 (SILVA; WINKLER; PALLANSCH, 1996).

Um estudo de vigilância epidemiológica para o EV71, revelou uma positividade de 5,6% em amostras coletadas de pacientes com doença neurológica aguda com idades até 15 anos (TAKIMOTO *et al.*, 1998).

Em um estudo realizado no Sul do Brasil, analisou-se amostras de LCR, por meio de metodologias de biologia molecular, de pacientes imunocomprometidos para a detecção de vários patógenos virais, foram observados resultados positivos em 12% das amostras e detectados vários microorganismos da família herpes, sendo que dois pacientes apresentaram resultados positivos para EV, um paciente adulto HIV positivo e uma criança coinfectada por EV/*Mycobacterium sp* (CHESKY *et al.*, 2000).

Vários trabalhos foram desenvolvidos no Estado do Pará e relataram a detecção do EV em amostras de LCR coletadas de pacientes com suspeitas de meningite asséptica e deficiência motora. Observou-se que em 60% das amostras positivas para EV 66,6% estavam relacionadas à deficiência motora e 33,3% à meningite asséptica (GOMES; KOPECKA; LINHARES, 2001). Na cidade de Belém, amostras de soro foram coletadas de pacientes que apresentavam sintomas de febre e exantema. Observou-se por metodologias de cultivo celular e neutralização uma positividade para EV71 de 45,4%, 24,4%, 19,3% e 10,9% para os grupos de idades de até 3 anos, 4 a 7 anos, 8 a 11 anos e 12 a 15 anos, respectivamente (GOMES *et al.*, 2002). Outro estudo realizado em Belém demonstrou o envolvimento do echovirus 30 em amostras coletadas de pacientes com sintomas de meningite asséptica. Observaram-se resultados positivos em 10,7% das amostras, sendo que a maioria era de pacientes até 15 anos (GOMES *et al.*, 2007), em outro estudo obteve-se uma positividade de 19,7% (CASTRO *et al.*, 2009).

Um relato de caso evidencia o primeiro isolamento de EV71 no Norte do Brasil de uma paciente hospitalizada com deficiência motora ascendente. A amostra será avaliada sequenciada e os resultados comparados com outros isolados no Brasil, com o objetivo de evidenciar diferenças moleculares, as quais poderão explicar porque os vírus de outros continentes são mais virulentos (LAMARÃO; MACIEL; GOMES, 2003). Com o objetivo de isolar e identificar os diferentes sorotipos de EV envolvidos nas meningites assépticas, Lamarão *et al.* (2005) avaliaram amostras de LCR e obtiveram 13,2% de amostras positivas, a maioria de

pacientes com idades <11 anos. Os sorotipos isolados foram echovirus 30 e 4 e coxsackie B5. O autor ressalta a importância de dados de outras regiões para compor o quadro nacional sobre os EV ainda pouco definido (LAMARÃO *et al.*, 2005).

Coletou-se LCR de várias regiões do Brasil, de pacientes com sintomas de meningite e por meio do cultivo celular observou-se 15,8% de amostras positivas. Análises moleculares demonstraram grande prevalência do echovirus 30. Foram identificados cinco surtos durante a vigilância, três ocorridos no Estado do Paraná, um no Recife e um no Rio Grande do Sul (SANTOS *et al.*, 2006).

Amostras de LCR, fezes e soro de pacientes com suspeita de meningite viral foram coletadas no período de 1998 a 1999 no Estado de São Paulo. Vinte e uma amostras foram analisadas e 62% das amostras apresentaram resultados positivos com isolamento do echovirus 30 (MACHADO *et al.*, 2007).

Foram coletadas amostras de pacientes com suspeita clínica de infecção viral no SNC. Foi identificado vírus por meio de ensaio de PCR em 23,34% das amostras, sendo os EV responsáveis por 11,34% das amostras positivas, sendo observada coinfeção com citomegalovírus (MENDOZA *et al.*, 2006).

Outro surto por echovirus 30 foi relatado no Rio de Janeiro, em 2009. Um total de 573 casos de meningite asséptica foram notificados no ano de 2005, com uma incidência de 3,71 casos/100.00 habitantes. A maioria dos casos ocorreu em crianças com idades entre 1 a 9 anos, com predominância do sorotipo echovirus 30 (JUNIOR *et al.*, 2009).

Anticorpos neutralizantes para EV71 foram detectados em 12,4% dos indivíduos do Estado de São Paulo, demonstrando uma baixa taxa de proteção e alta susceptibilidade a doenças relacionadas ao EV71, o que é preocupante frente aos recentes surtos por EV71 em regiões asiáticas (LUCHS *et al.*, 2010).

Uma pesquisa realizada no Brasil, no Estado da Bahia, em amostras de fezes de crianças <6 anos de idade com diarreia aguda, demonstrou 16,1% de resultados positivos para HPeV, confirmando a sua distribuição mundial do vírus (DREXLER *et al.*, 2009).

Outro estudo avaliou diferentes variantes do HPeV que circularam nos últimos cinco anos nas regiões do centro da Europa, Sudeste da Ásia e América do Sul (incluindo o Brasil). Os achados demonstram diferenças moleculares,

epidemiológicas e de associação clínica substanciais devidas às recombinações dos tipos 1 e 3 do HPeV (CALVERT *et al.*, 2010).

2.5.2 Epidemiologia dos enterovírus no Estado do Paraná

Nos anos de 1995 a 2003, relatou-se a incidência das meningites de todas as etiologias no Estado do Paraná, o número de notificações variou de 612 a 896 por ano, especificamente no ano de 2003 observou-se uma diminuição do número de notificações das meningites virais e um aumento da taxa de letalidade (13,9%), devido um maior número de formas graves de meningite bacteriana. Porém, mesmo com a diminuição dos casos de meningites virais, é a etiologia predominante (CURITIBA, 2004).

Dados compilados de 1996 a 2010 indicam que uma média de 707 casos de meningites de todas as etiologias são notificados anualmente, estimando-se que 54% dos casos são de meningite de causa viral (PARANÁ, 2011).

Foi demonstrada a distribuição demográfica dos casos de meningite viral e as características socioambientais dos casos notificados na cidade de Curitiba, utilizando o geoprocessamento como ferramenta de análise. A análise espacial foi realizada em 1.325 casos de meningite ocorridos em Curitiba no período de janeiro a dezembro de 2006. Selecionou-se, por meio de análise dos dados, pacientes com suspeita de meningite viral. Nesse estudo observou-se a ocorrência de casos em todo o município, com maior incidência em bairros com características de áreas de sub-habitação com a presença de assentamentos (figura 4) (BONATO & YANO, 2008).

No ano de 2006, Silva *et al.* relataram um surto de echovirus 30 com amostras de várias partes do Brasil, inclusive do Paraná. Até o momento, outros tipos virais da família *Picornaviridae* não foram relatados no Paraná.

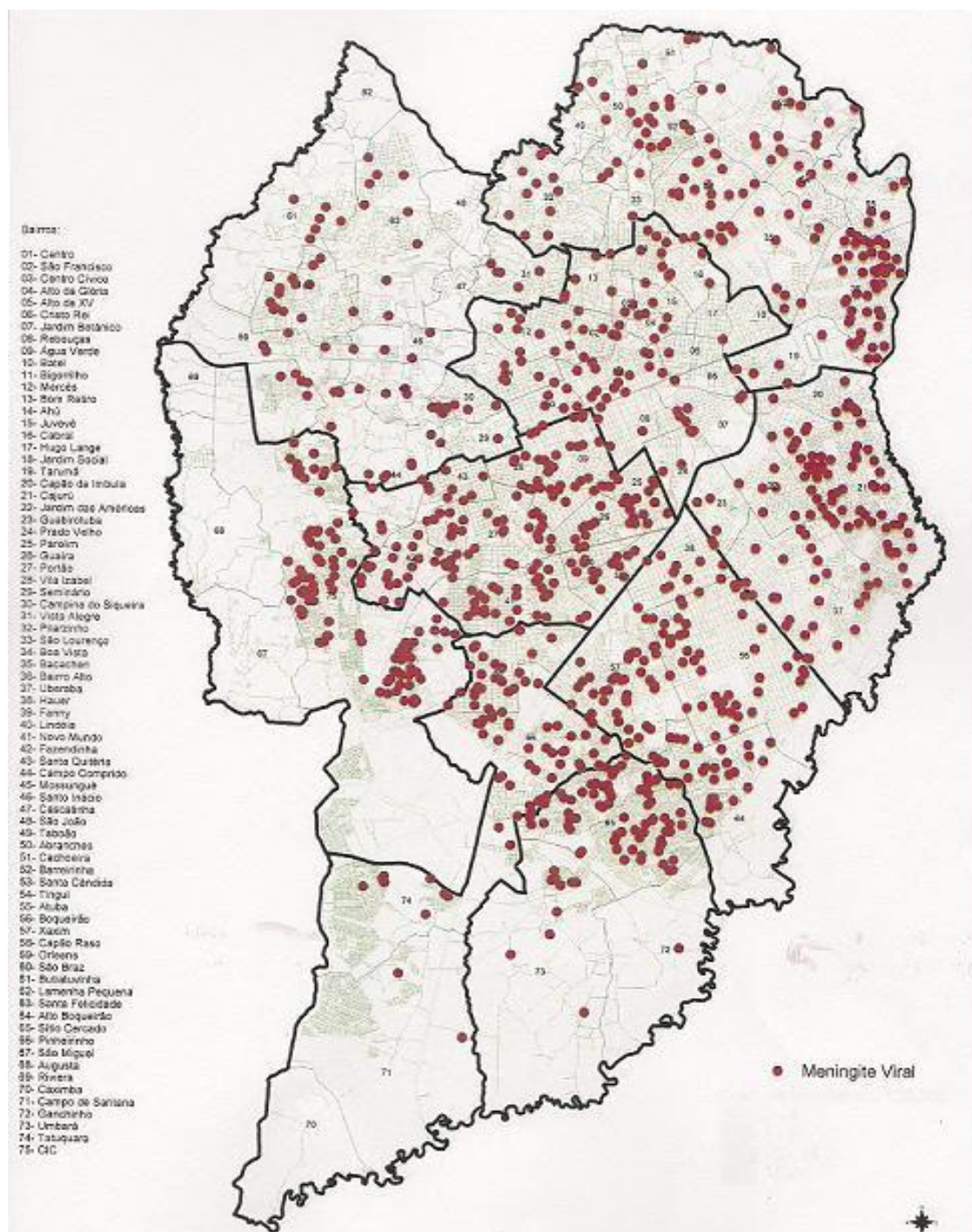


FIGURA 4 – DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS CASOS NOTIFICADOS DE MENINGITES VIRAIS EM CURITIBA POR BAIRROS.

FONTE: Bonato e Yano (2008).

2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.6.1 Características celulares e bioquímicas do LCR

Após a verificação dos sinais e sintomas clínicos apresentados pelo paciente, a análise do LCR é essencial para auxiliar no diagnóstico diferencial das meningites (quadro 2). Em pacientes com meningite por EV, a contagem de células periféricas no LCR e níveis de proteína e glicose variam consideravelmente (WILDIN & CHONMAITREE, 1987).

QUADRO 2 – CARACTERÍSTICAS DO LCR NORMAL E PRINCIPAIS ALTERAÇÕES NAS MENINGITES.

		Meningites		
Características	Normal	Bacteriana aguda	Viral	Crônica
Pressão intracraniana inicial (mm/H ₂ O)	100-200	N ou ↑	N ou ↑	N ou ↑
Aspecto/cor	L/I	Turvo/purulento branco	L/I	L/I
Nº células/mm ³	Até 4	>1000	500-1000	<500
Tipo celular	Linfócitos	Neutrófilos	Linfócitos	Linfócitos
Proteínas (mg/dL)	V 5-10 SO 10-25 L 15-45	↑↑	N ou ↑	N ou ↑
Glicose (mg/dL)	2/3 do soro	↓	N	N ou ↓
Ácido láctico (mmol/L)	<3,5	>3,5	<3,5	<3,5

FONTE: adaptado de Almeida *et al.* (2007).

NOTA: N = normal; ↑ = aumentado; ↓ = diminuído; L = levemente turvo; I = Incolor; V = ventricular; SO = subocciptal; L = lombar.

Um LCR normal pode conter de 3 – 5 leucócitos/mm³ em adultos e 20 leucócitos/mm³ em neonatos, não há um consenso e a variação está entre 0 – 30 células/mm³. A contagem diferencial de leucócitos em LCR normal é de aproximadamente 70% de linfócitos e 30% de monócitos, ocasionalmente, pode-se encontrar eosinófilos ou polimorfonucleares. Linfocitose ocorre, frequentemente, no LCR nas meningites virais, fúngicas e por tuberculose, no entanto, predominância de

polimorfonucleares pode ocorrer nos estágios iniciais dessas infecções. Também o LCR em aproximadamente 10% dos casos pode apresentar linfocitose nos estágios iniciais da meningite bacteriana quando a contagem total de leucócitos é <1.000 leucócitos/mm³ (SEEHUSEN; REEVES; FOMIN, 2003). Estudos sugerem que mais de 50% das amostras de LCR nas meningites virais podem ter predominância de neutrófilos no início da infecção e, a partir de quatro a seis horas, pode-se observar uma inversão, com predomínio de linfócitos (LEE & DAVIES, 2007).

Os níveis normais de proteínas totais no LCR, no nível lombar, estão entre 15 – 45 mG/dL a partir de 6 a 12 meses de idade. Em neonatos, a concentração é de até 150 mG/dL (1,5 G/L) (SEEHUSEN; REEVES; FOMIN, 2003). Acima de um ano, os níveis de glicose no LCR representam 2/3 da glicose sérica. Em neonatos varia muito mais do que nos adultos, sendo que a proporção glicose no LCR e glicose sérica é geralmente maior que nos adultos. Nas meningites virais os níveis de glicose são usualmente normais (LEE & DAVIES, 2007).

A análise do ácido láctico no LCR constitui-se em um teste útil para diferenciar as meningites virais das bacterianas desde que, em alguns casos, há dificuldades de se estabelecer um diagnóstico de certeza baseados nos parâmetros de celularidade e bioquímica do LCR (ALMEIDA *et al.*, 2009). Estudos relatam que os níveis de ácido láctico são muito maiores nas meningites bacterianas em relação às meningites virais. A glicose é processada glicoliticamente nos astrócitos, os quais liberam lactato como substrato metabólico para os neurônios (TSACOPOULOS & MAGISTRETTI, 1996). Huy *et al.* (2010), com o objetivo de confirmar a utilidade da quantificação do ácido láctico no LCR para diagnóstico diferencial das meningites, realizaram uma revisão sistemática e meta-análise de estudos de concentração de lactato como marcador das meningites bacterianas e virais. Foram analisados 25 artigos e realizados vários testes estatísticos, demonstrando que a acurácia da quantificação do ácido láctico foi maior que os marcadores convencionais do LCR, como glicose, coeficiente LCR/glicose no plasma, proteína e número total de leucócitos. Concluiu-se que o lactato foi o melhor parâmetro para a decisão clínica e para instituir o tratamento com antibióticos em crianças com suspeita de meningite bacteriana (HUY *et al.*, 2010).

Em uma análise de amostras de LCR de crianças com meningites bacterianas, observou-se que as quantificações do ácido láctico foram maiores que 2,4 mmol/L, a mesma análise para as meningites assépticas, as quantificações de

ácido láctico foram menores que 2.4 mmol/L. No estudo ressalta-se que o lactato foi o melhor preditor para a decisão clínica, como o uso de antibiótico para os pacientes com meningite bacteriana (NELSON *et al.*, 1986). Berg *et al.*, analisando níveis de lactato no LCR, observaram resultados significativos, concluindo que o lactato é um teste suplementar para o diagnóstico das meningites (BERG; GÄRDESELL; SKÅNSBERG, 1982).

Almeida *et al.*, (2009) analisaram a quantificação de lactato em amostras de LCR distribuídas em sete diferentes grupos, concluíram que a análise do lactato no LCR pode discriminar as meningites bacterianas e as virais com alta sensibilidade (80%) e especificidade (97%) (ALMEIDA *et al.*, 2009)

A análise laboratorial do LCR confere características importantes para o diagnóstico das meningites. Diferenciar as meningites agudas das crônicas e identificar os agentes etiológicos (quadro 2, p. 40) são os principais objetivos. Nesse contexto, as investigações por meio de metodologias de biologia molecular são decisivas, uma vez que, é descrito que os achados laboratoriais como contagem diferencial de células e análises bioquímicas podem variar muito nas infecções por vírus (WILDIN & CHONMAITREE, 1987; ALMEIDA *et al.*, 2007). Frequentemente, o agente causal das meningites virais não é identificado, porém, o diagnóstico laboratorial dessas doenças é importante para a identificação do agente etiológico, a fim de se direcionar o devido manejo clínico do paciente. Além disso, podem-se eliminar testes desnecessários, reduzindo o uso dos antibióticos e resultando em diagnósticos mais acurados que irão contribuir para um melhor prognóstico do paciente (WILDIN & CHONMAITREE, 1987).

2.6.2 Diagnóstico laboratorial dos enterovírus e parechovírus

2.6.2.1 Cultura celular

Em 1908, Landsteiner e Popper evidenciaram que a poliomielite é uma doença causada por vírus, após a transmissão em macacos utilizando um filtrado. Posteriormente, identificaram-se três sorotipos de poliovírus, foi uma das primeiras viroses propagadas em tecidos por Enders *et al.* (1949), o que possibilitou o

desenvolvimento por Salk da vacina inativada por formalina, em 1953, e a vacina de vírus vivo-atenuado por Sabin, em 1955. Nesse período, Daldorf e Sickles (1948) isolaram de amostras fecais de duas crianças, durante um surto de poliomielite, viroses não reconhecidas. Esses patógenos, quando inoculados em camundongos neonatos, induziam paralisia, em contraste, os poliovírus usualmente causam doença em primatas. Essas viroses foram chamadas de vírus coxsackie, posteriormente vírus coxsackie A (CAV). Os CAV induzem paralisia flácida, diferentemente dos coxsackie B (CBVs), que induzem paralisia espástica em camundongos. Estudos em animais experimentais revelaram que os EV são capazes de afetar diferentes órgãos, o que propiciou a classificação de mais de cem sorotipos de EV. Com a introdução de técnicas de cultivo celular no laboratório, foi possível isolar vírus que não replicavam em animais experimentais, os echovirus, assim nominados devido à sua associação com a doença humana “Enteric, Cytopathogenic, Human, Orphan” (ECHO = doença não associada) (HYYPİÄ *et al.*, 1997).

O diagnóstico laboratorial das meningites virais tem grande importância para definir o manejo clínico e o prognóstico do paciente. Os benefícios incluem o uso adequado de antibióticos, diminuição do tempo de hospitalização, todos os riscos da hospitalização, acurácia no diagnóstico e especificação do agente causal. Determinar o agente etiológico tem impacto principalmente em pacientes sem pleocitose, em neonatos e crianças com sequelas da infecção e pacientes imunossuprimidos (WILDIN & CHONMAITREE, 1987). Avaliando o impacto do resultado obtido por PCR na redução de hospitalização e uso de antibióticos, um estudo em crianças ≤ 90 dias com 34,8% de amostras positivas, observou-se uma redução na hospitalização de 1,54 dias e de 33,7% no uso de antibióticos (KING *et al.*, 2007). Inicialmente, com o desenvolvimento das técnicas de cultivo celular (1950), foi possível reconhecer os agentes etiológicos das meningites virais, principalmente os EV, responsáveis pela maioria das infecções e cultiváveis em linhagens apropriadas. Porém, a metodologia tem limitações para sua utilização no diagnóstico, pois, o efeito citopático, pode ser observado tardiamente, apresenta baixa sensibilidade (65 a 75%), além disso, exige um alto grau de desempenho técnico e alguns sorotipos têm um crescimento pobre em cultivo celular (ROTBART *et al.*, 1997; RAMERS *et al.*, 2000). O cultivo celular, além das desvantagens já descritas, pode não recuperar cargas virais baixas. Estudos indicam que o cultivo

viral detecta replicação em somente 60% dos casos de meningite asséptica (WILDIN & CHONMAITREE, 1987; BERLIN *et al.*, 1993). Frequentemente, a punção lombar é realizada na suspeita de meningite. Comumente, os testes utilizados para análise do LCR são dosagem dos níveis de proteínas e glicose, contagem celular e diferencial, microscopia e cultura. Testes adicionais como pressão intracraniana na abertura, cor de sobrenadante, aglutinação em látex e, mais recentemente, as técnicas de biologia molecular podem ser utilizados (SEEHUSEN; REEVES; FOMIN, 2003). Baseando-se nas metodologias existentes e parâmetros já estabelecidos, é consenso que, para a recuperação dos EV, o uso de múltiplas análises poderá aumentar a sensibilidade diagnóstica.

2.6.2.2 Métodos moleculares aplicados no diagnóstico das meningites virais

Atualmente, estão disponíveis as metodologias de biologia molecular, que são extremamente importantes, pois apresentam ótimas sensibilidade e especificidade na detecção dos diferentes agentes etiológicos das meningites virais (quadro 3).

QUADRO 3 – AGENTES ETIOLÓGICOS DAS MENINGITES VIRAIS.

Comuns	Menos frequentes	Raros
Enterovírus	HSV-1	Adenovírus
Coxsackievirus A e B	Vírus da Coriomeningite Linfocítica	CMV
Echovirus	Caxumba	EBV
Arbovírus		Influenza A, B
HIV		Sarampo
HSV-2		Parainfluenza
		Rubeola
		VZV
		HHV-6

FONTE: Newton (1999).

A PCR tem sido amplamente descrita e utilizada, já que oferece inúmeras vantagens em relação a outras metodologias (CARSTENS *et al.*, 1992; CASAS *et al.*, 1995a, 1995b, 1997, 1999; LAKEMAN *et al.*, 1995; CHESKY *et al.*, 2000; JOHNSON *et al.*, 2000; LEWIS & GIBBON, 2000; RAMERS *et al.*, 2000; MARKOULATUS *et al.*, 2001; READ; MITCHEL; FINK, 2001; COLIMON, 2002; MINJOLLE *et al.*, 2002; GUNEY *et al.*, 2003; CINQUE *et al.*, 2003; TAFRESHI *et al.*, 2005; McIVER *et al.*, 2005; PEIGUE-LAFEULLE *et al.*, 2006). As técnicas de PCR permitem a síntese *in vitro* de milhões de cópias do segmento de um gene específico, possibilitando uma rápida detecção e de um número pequeno de cópias, como uma a dez cópias do DNA alvo. Várias técnicas estão disponíveis para a detecção e quantificação dos ácidos nucleicos virais no LCR, tais como: amplificação baseada na sequência de ácido nucleicos (NASBA), o ensaio de b-DNA e PCR em tempo real. Essas metodologias estão sendo utilizadas na amplificação específica do ácido nucleico do RNA dos EV de vários tecidos infectados. Esses ensaios baseiam-se no fato de que várias regiões da porção 5' do genoma são altamente conservadas entre os diferentes tipos de EV (DeBIASI; TYLER, 2004). A sensibilidade analítica e especificidade da PCR convencional, em comparação com o cultivo celular, foram estabelecidas em um estudo, sendo 89% e 66%, respectivamente, a diferença estatística foi relevante ($p = 0,016$) (GUNEY *et al.*, 2003). Quanto à sensibilidade diagnóstica da metodologia de PCR observa-se uma porcentagem de 66% ou >90%, quando comparada ao cultivo celular, que apresenta baixa sensibilidade. (SAWYER *et al.*, 1994; OBERSTE *et al.*, 2000). Relatou-se que somente 45% dos casos diagnosticados de meningites são confirmados pelo diagnóstico laboratorial (OOSTENBRINK *et al.*, 2001).

O diagnóstico laboratorial dos EV foi realizado para definição de um surto de meningite (1992). Foi utilizada a metodologia de cultivo celular e PCR com iniciadores específicos descritos por Chapman *et al.* (1990) para a região terminal 5' do genoma viral. Casas *et al.* (1995) compararam métodos de extração e concluíram que o tampão contendo tiocianato de guanidina é eficiente tanto quanto os métodos convencionais que existiam. Técnicas de multiplex para a detecção simultânea de EV e herpesvírus são utilizadas e detectam entre 1 a 100 moléculas de DNA. A técnica utiliza um total de 14 oligonucleotídeos para a pesquisa da porção do genoma 5' NC e da DNA polimerase para os herpesvírus (CASAS *et al.*, 1997).

Utilizou-se reagente comerciais (AMPLICOR EV, Roche Diagnostic) de PCR, que possibilitaram um resultado em cinco horas, tanto para LCR, soro, urina e swab nasal. Observou-se uma sensibilidade do kit de PCR (*versus* cultivo celular) para o diagnóstico do EV de 100% para LCR e 77% para urina (ROTBART *et al.*, 1997). Outro estudo utilizando o mesmo reagente com amostras de LCR foi realizado e os resultados comparados por RT-PCR convencional e cultivo celular. Observou-se replicação celular em 26% das amostras, 86% de amostras positivas no teste comercial e 92% de amostras positivas no teste convencional (POZO *et al.*, 1998).

O teste de neutralização, “padrão ouro” para tipagem dos EV é de difícil manuseio, um procedimento demorado e que pode falhar na identificação de isolados devido à agregação de partículas virais, mutações antigênicas, recombinação na região do capsídeo ou à presença de múltiplos vírus em uma mesma amostra. O teste de neutralização inclui anticorpos contra somente 40 dos sorotipos do EV humano, sendo a análise da sequência de nucleotídeos da região VP1 do genoma do EV utilizada para discriminar a maioria dos diferentes tipos virais (OBERSTE *et al.*, 2000).

A metodologia de PCR utilizando o sistema LightCycler® é outra alternativa para a análise de infecções por EV. O desempenho do sistema comparado ao PCR convencional foi similar, no entanto, possui vantagens, pois confere maior rapidez à pesquisa, possibilita adaptar o ensaio de PCR multiplex ao sistema LightCycler, oferece maior segurança contra contaminação e a não utilização do brometo de etidium nos géis de agarose (READ; MITCHEL; FINK, 2001).

Na última década, diferentes ensaios de transcrição reversa seguida da PCR (RT-PCR), tendo como alvo o segmento 5' NC, têm sido aplicados, pois o resultado rápido tem grande impacto no diagnóstico clínico. A detecção rápida do genoma RNA dos EV em amostras de LCR, para o ensaio de transcrição reversa seguida de PCR em tempo real, está sendo utilizada com grandes vantagens (VERSTREPEN *et al.*, 2001). O ensaio mostrou-se mais sensível quando comparado com o cultivo celular, apresentando uma sensibilidade de 100% e especificidade de 96,2% e os resultados são disponibilizados em quatro horas, além de eliminar o passo da detecção pós-amplificação. Requer menos manuseio e reduz o risco de contaminação por manipulação (VERSTREPEN *et al.*, 2001).

Desenvolveu-se uma estratégia de PCR em tempo real para detecção simultânea de EV e HPeV utilizando-se o equipamento LightCycler-I® - Roche em

amostras de sangue, fezes, aspirado nasofaríngeo e LCR de pacientes com suspeita de meningite viral. Observou-se que 33,9% dos pacientes foram positivos para EV e 9,7% para parechovírus (NOORDHOEK *et al.*, 2008).

Devido ao grande número de patógenos envolvidos nas infecções do SNC, o volume de LCR é a limitação do teste. A técnica capaz de superar essas limitações é a hibridação do DNA-microarranjo, que demonstrou sensibilidade de 93%, especificidade de 100% e valor preditivo negativo de 100% e positivo de 83%. A sensibilidade analítica do método foi de 500 genomas equivalentes/mL, 0,3 – 50% doses infecciosas em cultura celular (BORISKIN *et al.*, 2004; KORIMBUCUS *et al.*, 2005). Existe uma grande variedade de microorganismos que podem causar doenças, as técnicas de multiplex poderão ser utilizadas e têm a vantagem de testar vários agentes em um tubo com sensibilidades que variam de 66% a 100%, com 100% de especificidade (McIVER *et al.*, 2005).

Apesar das ótimas sensibilidade e especificidade da PCR em comparação com o cultivo celular para alguns autores o valor da epidemiologia molecular é discutível. No estudo de Hosoya *et al.* (1998) concluiu-se que os métodos moleculares devem ser considerados em conjunto, com resultados de outras metodologias.

Diversos estudos têm relatado importantes vantagens sobre o diagnóstico, utilizando amostras de LCR. Certos aspectos clínicos e técnicos só poderão ser clarificados com estudos homogêneos, prospectivos e multicêntricos (COLIMON, 2002). Atualmente, observa-se que muitos e diferentes protocolos diagnósticos (figura 5) têm sido utilizados para evidenciar a infecção pelos EV e apesar da grande utilidade da biologia molecular, no diagnóstico das meningites virais, é necessária à adoção de medidas para padronização e utilização das referidas técnicas.

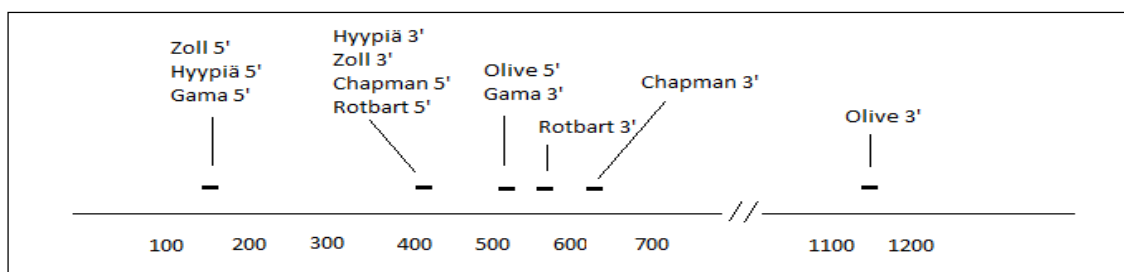


FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DE ALGUNS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO SEGMENTO 5' NC DOS ENTEROVÍRUS.

FONTE: adaptado de Sawier *et al.* (1994).

2.6.3 Caracterização molecular dos enterovírus e parechovírus humanos

O sequenciamento genômico e a análise filogenética dos EV foram utilizados inicialmente como ferramenta epidemiológica e diagnóstica para os poliovírus. Vários projetos adotaram a mesma estratégia para os EV não poliovírus, porém, não foram obtidos dados consistentes que continham sequências homólogas de todos os sorotipos de EV humanos (OBERSTE; MAHER; PALLANSCH, 1998; SHOJA *et al.*, 2007).

O ensaio de neutralização foi o ensaio de referência para identificar os EV por aproximadamente 50 anos, até a introdução de métodos de tipagem molecular, porém, reações cruzadas fracas ou não recíprocas eram frequentemente observadas, levando a interpretações não conclusivas (OBERSTE *et al.*, 1999b; 2000; 2003). A sequência do gene VP1 do capsídeo viral apresenta correlação com o sorotipo viral, determinado por métodos antigênicos, alvo ideal para detectar e identificar os EV. Nesse sistema, sequências nucleotídicas com identidade de pelo menos 75% são consideradas cepas do mesmo sorotipo (NIX; OBERSTE; PALLANSCH, 2006).

Até o momento, o sequenciamento completo de genomas de EV humanos tem sido publicado e, apesar de as comparações entre as sequências parcialmente suportarem a classificação sorotípica dos EV em PV, CAV, CBV e ECHO, em muitos casos as comparações genéticas não se correlacionam com essa divisão, uma reclassificação foi proposta e publicada (KING *et al.*, 2000).

As porções NC do genoma do EV são altamente conservadas, como exemplo têm-se que as três cepas dos poliovírus apresentam 85% de identidade na porção 5' NC e aproximadamente 90% na porção 3' NC (STANWAY *et al.*, 1984). A sequência 5' NC pode ser dividida em conservada (nucleotídeos 1 ao 650) e hipervariável (nucleotídeos 651 ao 750), variação observada entre as cepas de poliovírus para os EV sequenciados mostra, principalmente, uma mudança compensatória de base que suporta as estruturas propostas de "stem-loop", particularmente entre os nucleotídeos 440 e 600 do genoma dos EV. As variações que ocorrem são silenciosas. Nessa região observa-se perfeita conservação entre os grupos de EV os iniciadores e sondas são desenhados para reconhecê-la nos ensaios por PCR (HOVI; STERVIK; ROSENLEW, 1996; HYYPIÄ *et al.*, 1997).

Encontra-se maior variação entre as sequências da região VP1 do genoma, a qual codifica para os maiores sítios antigênicos e os determinantes de neutralização tipo específicos. A similaridade entre os aminoácidos da região que codifica o capsídeo é de pelo menos 71% em um grupo e varia de 53% a 68% entre grupos (HYYPIÃ *et al.*, 1997; PÖYRY *et al.*, 1996). Proteínas não estruturais possuem menor variação genética do que as proteínas estruturais. Enquanto variações nas proteínas do capsídeo são vantajosas, pois possibilitam ao vírus o escape às respostas imunológicas do hospedeiro, variações nas proteínas não estruturais – muitas delas enzimas – podem ser deletérias. As diferenças genéticas entre as cepas podem ser demonstradas pela determinação das sequências nucleotídicas dos produtos de PCR, o que fornece informação detalhada e discriminação entre as cepas. O método utiliza iniciadores para amplificação de sequências alvo para uma região variável na junção VP1-2A, o que possibilita discriminação entre as cepas (MUIR *et al.*, 1998).

Estratégia de purificação do ácido *nucléico* e sequenciamento “shotgun”, adotada por Allander *et al.* (2005), caracterizou-se múltiplos picornavírus e 50% pertence ao gênero enterovírus, família *Picornaviridae*, o último recentemente caracterizado foi nominado de cosavírus A1 (KAPOOR *et al.*, 2008). A análise do gene VP2 do EV por sequenciamento revelou uma pobre discriminação entre os diferentes sorotipos. A análise pode ser útil para agrupar os vírus em um grande ramo e identificar recombinantes intratipos (OBERSTE; MAHER; PALLANSCH, 1998).

A análise da sequência de EV humanos foi realizada por três métodos de análises, os resultados mostraram que cada método identificou diferentes EV e a acurácia das análises depende dos parâmetros escolhidos, sendo, a complexidade do gênero limitante para a correta identificação do vírus (PALACIOS *et al.*, 2002).

Oberste *et al.* (2004) apresentaram o sequenciamento completo do genoma dos EV do grupo A, (CV) A2-A8, A10, A12, A14, A16 e EV71, observou-se pela análise que a recombinação genética tem um papel importante na evolução do EV71 (OBERSTE *et al.*, 2004).

De acordo com os estudos de Oberste *et al.* (1999c), existem 4 grupos geneticamente distintos de echovirus 30 e são designados como 1,2, 3 e 4 (subgrupos 4a e 4b).

2.7 FATORES INTERFERENTES NAS REAÇÕES DE PCR

A introdução dos métodos moleculares apresenta um grande progresso no diagnóstico das infecções do SNC. No entanto, problemas técnicos persistem, como: contaminação pelos amplicons, levando a resultados falsos-positivos; a presença de inibidores, que leva a resultados falsos-negativos; e problemas intrínsecos à amostra. Cuidados com a contaminação são essenciais, o planejamento da estrutura física e reagentes comerciais tem melhorado a atuação dos testes de biologia molecular. A presença de inibidores, ou seja, moléculas que afetam o correto funcionamento das enzimas levam à inibição da amplificação e está presente em 1 – 5% das amostras de LCR (TANG *et al.*, 1999).

2.7.1 Tempo de coleta

No estudo de Davies *et al.*, discute-se que tempo de coleta do LCR em relação ao início dos sintomas, pode ser crítico, e que amostras coletadas precocemente (< 3 dias) e tardiamente (> 14 dias ou mais) reduzem a probabilidade de detecção do patógeno. Essa observação é comprovada nos casos de encefalites por HSV. No entanto, para outras doenças, serão necessários estudos utilizando-se diferentes amostras de LCR, coletadas individualmente e em tempos diferentes. Essa estratégia tem por objetivo definir a janela entre o início dos sintomas, a coleta do LCR e, ainda, definir se esse tempo é variável entre pacientes com diferentes apresentações clínicas ou infecções diferentes (DAVIES *et al.*, 2005).

2.7.2 Presença de substâncias interferentes

A maior limitação nos testes diagnósticos baseados na reação de PCR é a inibição da Taq polimerase por muitas substâncias presentes no material clínico. A presença de hemoglobina, especificamente o anel de porfirina na molécula da hemoglobina, está comprovadamente relacionada com a inibição na reação de PCR (DEBIASI; TYLER, 2004). A presença de sangue em 1% (v/v) da amostra é suficiente para inibir uma reação de PCR. Essa inibição não é dependente de íons

magnésio, portanto, a inibição da reação de amplificação pode ocorrer de 1 – 5% das amostras de LCR (TANG *et al.*, 1999). A análise direta da amostra clínica exige um passo de purificação para minimizar o efeito dos agentes inibitórios. Também foi demonstrado que, diferentes termopolimerases diferem dramaticamente na sua habilidade de produzir resultados positivos, utilizando-se diretamente amostras clínicas (PANACCIO; LEE, 1991).

Sawyer *et al.* (1994), discutem que o LCR inibe a amplificação do RNA dos EV e que a natureza da inibição é desconhecida e resiste à digestão pela proteinase e fervura, indicando que não é uma proteína o fator inibitório (SAWYER *et al.*, 1994).

2.7.3 Contaminação por aerossóis

Embora as metodologias moleculares apresentem grandes vantagens, como altas sensibilidade e especificidade, também apresentam uma deficiência específica: uma forte susceptibilidade à contaminação com seu próprio produto. A maior fonte contaminação nos laboratórios de biologia molecular são os amplicons (COLIMON, 2002). Para prevenção desses problemas há a necessidade da adoção de medidas de controle das contaminações. A fonte mais importante e crucial de contaminação nos laboratórios são os aerossóis de amplicons de PCR. Métodos para minimizar essas contaminações vão desde ao planejamento do espaço físico, que inclui três salas separadas fisicamente: sala 1, para o preparo das misturas dos reagentes para a reação de amplificação; sala 2, para a extração do material genético; sala 3, para amplificação e detecção dos produtos gerados na reação de PCR, sendo que o fluxo de utilização das salas é impreterivelmente da sala 1, 2 e 3. Todos os materiais utilizados nas diferentes salas são exclusivos, como: ponteiras com barreiras e tubos livres de enzimas (DNA/RNAses), que possam degradar o material genético, micropipetas aferidas (TANG *et al.*, 1999).

2.7.4 Interpretação dos resultados

A detecção de certos vírus com características de latência (vírus da família *herpesviridae*) pode ocorrer, porém, não estão associados com doença. Genomas

virais podem ser encontrados em síndromes não infecciosas do SNC, como o poliomavírus JC ou o HHV-6, genomas demonstrados na esclerose múltipla, porém, sua associação com a doença ainda não foi confirmada (CINQUE *et al.*, 2003).

Para alguns agentes, a sensibilidade da reação de PCR é baixa, ocasionando resultados falsos-negativos. Outro fator importante que contribui para resultados falsos-negativos é a baixa carga viral, devido ao tempo de coleta da amostra ou à clarificação do agente mediante uma resposta imunológica robusta (DeBIASI; TYLER, 2004).

Além disso, a técnica de PCR tem uma limitação, diferentes protocolos para cada vírus têm sido utilizados em diversos laboratórios, sem padrões para avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica, tornando difícil a comparação dos resultados entre os laboratórios. A pesquisa utilizando o LCR pode levar a erros devido a uma validação do teste inacurada, qualidade dos reagentes e equipamentos, bem como a habilidade do técnico para o desenvolvimento da metodologia (CINQUE *et al.*, 2003).

Para o desenvolvimento das reações de amplificação, não são necessárias partículas virais viáveis, portanto, as amostras podem ser estocadas adequadamente por longo período. O DNA pode ser recuperado de amostras estocadas a -20 °C (durante anos), 2 – 8 °C e até a temperatura ambiente por mais de 30 dias. O RNA é menos estável que o DNA, e o RNA do EV pode ser recuperado de amostras em armazenamento de 4 °C após 96 horas (CINQUE *et al.*, 2003).

2.8 OUTROS VÍRUS CAUSADORES DE MENINGITES

Outros vírus estão envolvidos nas doenças do SNC e são responsáveis por uma grande variedade de doenças humanas causadas por infecção primária ou por reativação em pacientes imunossuprimidos, como vírus herpes simplex em uma proporção de 2–19%. Vírus Epstein-Barr (EBV), citomegalovírus (CMV), vírus varicela zoster estão envolvidos em menor proporção, porém, podem causar complicações em indivíduos imunossuprimidos (SAWYER *et al.*, 1994; TRALLERO *et al.*, 2000; CINQUE *et al.*, 2003; FREIRE *et al.*, 2003).

Uma característica importante dos herpesvírus é a sua habilidade em se tornar latente, primariamente nos gânglios do SNC e tecido linfoide. O vírus da herpes simplex (HSV) e o vírus da varicela zoster (VZV) são latentes nos neurônios, e o EBV é latente nos linfócitos B. A maioria dos herpesvírus são neurotrópicos e causam doenças agudas ou crônicas do SNC (GILDEN *et al.*, 2007). A disseminação do vírus no SNC pode ocorrer pela corrente sanguínea ou pelos nervos, sendo que os dois processos não são específicos e exclusivos, por exemplo, os vírus da varicela zoster se disseminam para a pele pela corrente sanguínea para produzir uma erupção cutânea, posteriormente, seguem a rota dos axônios neuronais sensoriais, alcançando os gânglios trigêmeos ou dorsais, se tornando latentes. As cepas virais podem mostrar diferenças na capacidade de disseminação pelos nervos ou pela corrente sanguínea (TYLER; GONZALES-SCARANO, 1997). Muitas infecções virais se caracterizam por persistência do vírus no sistema nervoso, no cérebro, medula espinhal e gânglios sensoriais e por períodos de meses, anos ou a vida toda. A base molecular da persistência é complexa e parcialmente conhecida. A habilidade de um vírus persistir em um indivíduo imunocompetente, apesar de muitos mecanismos propostos, pelos quais as viroses fogem ao ataque do sistema imunológico, ainda é alvo de muitas dúvidas. Para estabelecer a persistência, o vírus deve replicar-se por longos períodos sem causar a morte do hospedeiro. A replicação deve ser atenuada e a capacidade replicativa restrita, porém, em indivíduos imunossuprimidos, a maioria dos vírus se torna persistente, causando a morte do hospedeiro (LIPTON; GILDEN, 1997).

As herpesviroses causam uma série de doenças de importância clínica. Especialmente doenças do SNC e complicações em pacientes imunocomprometidos podem resultar da infecção ou reativação dos vírus HSV1, HSV2, CMV, EBV, VZV, vírus herpes humano tipo 6 e vírus herpes humano tipo 7, o qual tem sido associado com exantema súbito é causa de complicações graves em pacientes transplantados (JÄÄSKELÄINEN *et al.*, 2006). A infecção por esses vírus pode causar inúmeros sinais e sintomas, variando desde lesão mucocutânea até doenças neurológicas (ABERLE; PUCHHAMMER-STÖCKL, 2002).

A encefalite pelo vírus herpes simplex é uma doença agressiva com significantes taxas de mortalidade e morbidade (LAKEMAN *et al.*, 1995). Varicella zoster vírus pode causar doenças neurológicas entre humanos. Ambas, infecção

primária e recorrente, podem levar à infecção neurológica e doença (ECHEVARÍA *et al.*, 1997).

Infecções emergentes podem ser definidas como doenças que infectam novos hospedeiros e tiveram sua disseminação em novas áreas geográficas, alteraram as características da patogênese ou são causas de agentes que ainda não foram reconhecidos como patogênicos. O número de doenças emergentes está aumentando e a grande maioria de patógenos emergentes é de vírus e príons (OLIVAL; DASZAK, 2005). Os autores relatam que aproximadamente 39% das doenças infecciosas emergentes virais produzem sintomas neurológicos graves. Embora as atenções estejam focadas em novos agentes, em 1979 um surto de poliomielite foi relatado em uma comunidade “Amish” não vacinada, que envolveu 13 casos de paralisia. Em 2007, 1.315 casos de poliomielite foram reportados no mundo, sendo a maioria na Índia (66%), Nigéria e outros locais da África. Apesar da grande redução de casos pela vacinação, casos importados podem ocorrer. Ainda, mutações entre cepas de poliovírus que ocorrem na natureza e sua combinação com a cepa vacinal podem levar a uma reversão para virulência (OLIVAL; DASZAK, 2005).

O mais recente exemplo de um vírus ser transmitido para um novo hospedeiro é o vírus “West Nile”, que foi inicialmente isolado em 1937, na Província de Uganda, e em 2002–2003 a doença teve proporções importantes nos EUA, produzindo aproximadamente 3.000 casos confirmados (OLIVAL; DASZAK, 2005).

Na Itália, o vírus Toscana, que é uma arbovirose, apresenta tropismo para o SNC, é, atualmente, relatado como a causa comum de meningites no verão da região central do país. Pacientes transplantados de órgãos sólidos e medula óssea, submetidos a um estado rigoroso de imunossupressão, são alvos de infecções causadas por viroses neurotrópicas, que incluem o vírus da raiva, vírus da coriomeningite linfocitária e o vírus polioma JC. Novos vírus têm sido descritos e causam doenças neurológicas, como os vírus Nipah, Hendra e Bat Lyssa (TYLER, 2009).

Além da importância da utilidade da PCR na identificação do agente etiológico de doenças do SNC, a metodologia permite a quantificação da carga viral, auxiliando no monitoramento da duração e adequação da terapia antiviral para vários agentes virais, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou infecção por vírus herpes simplex em neonatos. Adicionalmente, o uso de metodologias

moleculares propicia: (i) a diferenciação de uma infecção produtiva de uma doença pós-infecciosa imune mediada; (ii) a determinação de genes de resistência a antivirais; (iii) a investigação da etiologia de doenças do SNC ainda incertas, como esclerose múltipla, Alzheimer's e outras doenças neurodegenerativas (POZO; TENORIO, 1999; DeBIASI; TYLER, 2004).

No Brasil se tem poucos relatos para determinar a prevalência das infecções do SNC. Mendonza *et al.*, (2006) estudaram 200 amostras de LCR coletadas de pacientes com suspeita clínica de infecção do SNC. As amostras foram analisadas por PCR para detecção dos genomas de herpesvírus, enterovírus, alphavírus e flavivírus, definindo a prevalência de 23,34% dos diferentes vírus na região de Ribeirão Preto, bem como a etiologia das meningites e encefalites (MENDONZA *et al.*, 2006)

No Paraná, Vidal *et al.*, (2011) relataram resultados sobre a etiologia viral das meningites com amostras de LCR recebidas de três hospitais de referência. O estudo foi realizado com 460 amostras coletadas no período de julho de 2005 a dezembro de 2006. Os EV foram responsáveis pela maioria das amostras positivas (83%), seguidas dos agentes da família *Herpesviridae* (17%), dessas, o HSV foi responsável por 10% das amostras positivas, o HHV-6 por 3%, o EBV por 2% e 2% de infecção mista pelo enterovírus e EBV (VIDAL *et al.*, 2011). Outro estudo no Paraná investiga aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais das infecções pelos vírus da família *Herpesviridae* no SNC. O EBV foi o agente mais frequente nas amostras de LCR dos pacientes imunocomprometidos enquanto que no grupo dos imunocompetentes o agente mais frequente foi HHV-6 (PESSA, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo é observacional, transversal, prospectivo e descritivo. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da UFPR (Anexo 1), com registro no BANPESQ sob o número 2005016889. O termo de consentimento livre e esclarecido foi dispensado, os sujeitos não foram identificados.

3.1 CASUÍSTICA

No período de julho de 2005 a dezembro de 2006, foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia do HC-UFPR 671 amostras de LCR obtidas de pacientes com sinais e sintomas sugestivos de meningite aguda, por meio de punção lombar. As amostras tiveram origem em três hospitais da cidade de Curitiba: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC) e Hospital Pequeno Príncipe (HPP). Esses hospitais são referência em meningites e atendem Curitiba e Região Metropolitana. Os dados epidemiológicos e clínicos foram anotados na ficha epidemiológica (anexo 2), além disso, para as amostras oriundas do HC-UFPR foi possível acessar dados nos prontuários eletrônicos. Os dados epidemiológicos estão relacionados no apêndice 2.

O LCR, devidamente identificado, foi coletado em tubo de polipropileno com capacidade para 2,5 ml, esterilizado por óxido de etileno, livre de DNases e RNases. As amostras foram mantidas sob-refrigeração e transportado ao laboratório de virologia em um prazo máximo de 24 horas, acompanhado da ficha epidemiológica. No laboratório, foram imediatamente processadas e congeladas em freezer a -70°C . Adotou-se como critérios de inclusão e exclusão das amostras:

a) Critérios de inclusão

Considerou-se como quadro clínico de meningite: acometimento agudo (< 4 semanas) (COYLE, 1999), presença de febre ($> 38^{\circ}\text{C}$), sinais meningorradiculares e cefaléia.

Os padrões bioquímicos e citológicos do LCR foram definidos como: aumento de leucócitos acima de 4 células/ mm^3 , predomínio de linfócitos, glicose normal ($\geq 45\text{mg/dl}$) e ácido láctico no LCR $< 3,5\text{ mmol/L}$.

b) Critérios de exclusão

Amostras com suspeita clínica de encefalite definidas como: acometimento agudo (< 4 semanas) (COYLE, 1999), presença de febre ($> 38^{\circ}\text{C}$) e sinais e sintomas sugerindo envolvimento de parênquima cerebral (perda de consciência e/ou alterações de comportamento, convulsões ou sinais neurológicos focais).

Amostras com características bioquímicas e citológicas do LCR de meningite bacteriana aguda: contagem de leucócitos > 4 células, com predominância de neutrófilos, baixa dosagem de glicose (< 45 mG/dL) e ácido láctico $> 3,5$ mmol/L.

Amostras encaminhadas de forma inadequada, fora de refrigeração ou em tubos inadequados: pesquisa de outros agentes etiológicos no LCR, exceto vírus.

3.1.1 Grupo de estudo

Amostras de 440 pacientes, 259 (59%) do sexo masculino e 181 (41%) do sexo feminino foram incluídas no estudo. As idades variaram de 1 mês a 85 anos, mediana de 5 anos (IQ 3-8 anos). Foi realizada a análise citológica do LCR: hemácias com mediana de 6 células/mm³ (IQ 1,3 – 50), leucócitos com mediana de 80 células/mm³ (IQ 23 – 180 células/mm³), monócitos média de $10 \pm 27\%$, neutrófilos média de $10 \pm 27\%$; linfócitos de $40 \pm 44\%$; glicose de 68 mG/dL ($\pm 53, 62$), proteínas de 50 mG/dL ($\pm 31, 44$) e ácido láctico de 2,1 mmol/L ($\pm 0,47, 2,1$).

3.1.1.1 Cálculo das características operacionais das técnicas de biologia molecular

Com o objetivo de avaliar as características operacionais dos testes de PCR convencional e PCR em tempo real, utilizou-se como padrão ouro: (1) pacientes que preencheram os critérios de inclusão e exclusão do estudo; (2) características epidemiológicas, considerando-se que os EV são os principais causadores de meningite viral em todo o mundo (MUIR *et al.*, 1998; KING *et al.*, 2007), amostras coletadas nos meses de verão (período de 21 de dezembro a 20 de março) e primavera (período de 23 de setembro a 21 de dezembro) e pacientes com idades entre 4 a 14 anos; (3) o modelo preditivo multivariável para distinguir meningite bacteriana de meningite viral, todos os pacientes com scores 0 foram selecionados para compor o grupo de doentes (quadro 4) (anexo 3) (NIGROVIC; KUPPERMANN; MALLEY, 2002; BRIVET *et al.*, 2005).

QUADRO 4 – PONTUAÇÃO PARA MENINGITES BACTERIANAS E CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO PARA MENINGITES VIRAIS.

Critérios	Pontos	
	Presente	Ausente
Coloração de gram positiva	2	0
LCR Proteína ≥ 80 mg/Dl	1	0
Contagem absoluta de neutrófilos sangue periférico ≥ 10.000 cel/mm ³	1	0
Convulsões	1	0
Contagem absoluta de neutrófilos no LCR ≥ 1.000 cel/mm ³	1	0

FONTE: adaptado de Nigrovic; Kuppermann; Malley (2002) e Brivet *et al.* (2005).

a. Características operacionais do RT-PCR

Para esta análise, considerou-se como grupo de doentes pacientes com as características anteriormente definidas no item 3.1.1.1, p. 58. O grupo estava composto por 150 pacientes, dos quais 113 (61%) eram do sexo masculino, com mediana de idade de 6 anos (IQ 5–9). Características bioquímicas expressas em mediana e intervalo interquartil de glicose 63 mG/dL (IQ 59-71) e proteína de 41 mG/dL (IQ 30-53). Características celulares com medianas e intervalos interquartis de: hemácias 3,2 (IQ 1-14); leucócitos 77/mm³ (IQ 20-183); linfócitos 60% (IQ 20-94); neutrófilos 9% (IQ 0,07–57).

b. Características operacionais do PCR em tempo real

Para determinação das características operacionais da metodologia de PCR em tempo real, foram definidos grupos de pacientes doentes de acordo com os critérios estabelecidos no item 3.1.1.1, pag. 58, e selecionados para a técnica de PCR em tempo real.

Para este grupo foram selecionadas 78 amostras, 45 (58%) do sexo masculino, com mediana de idades de 6 anos (IQ 5–8), hemácias 3 (1,5-17), leucócitos de 86/mm³ (IQ 25–218), neutrófilos de 0% (IQ 0-12), linfócitos de 61% (IQ 6-99), glicose de 64 mG/dL (IQ 55– 73,5), proteína de 40 mG/dL (IQ 28,5-55) e ácido láctico de 2,3 (IQ 1,9-2,5). Adicionalmente, os resultados obtidos, das amostras selecionadas, para a realização da metodologia de PCR em tempo real foram comparados com os resultados obtidos da análise por RT-PCR para o cálculo da concordância.

3.1.1.2 Grupos controles para cálculo das características operacionais

a) Grupo controle negativo

Grupo composto por 26 amostras de LCR de pacientes sem sinais e sintomas de meningite aguda, com citologia e bioquímica normal, com as indicações clínicas de encefalopatia alcoólica, crise convulsiva, cirurgia cardiovascular (dois pacientes), miosite, prematuridade, doença hereditária degenerativa (dois pacientes), lúpus eritematoso, epilepsia, envenenamento, polineuropatia, acidente vascular cerebral, pacientes atendidos na unidade de pronto atendimento apresentando algum sinal ou sintoma clínico sugestivo de meningite, porém com análise de LCR normal. Este grupo apresenta como mediana de idade de 41 anos (IQ = 6-50), 52% das amostras de indivíduos do sexo masculino com características de celularidade e bioquímica do LCR: 2,8 hemácias/mm³ (IQ = 0,75-2); 0,9 leucócitos/mm³ (IQ = 0,6-2); glicose de 66 mG/dL (IQ = 60,5-73); proteína 30 mG/dL (IQ = 25-30) e ácido láctico 1,7 (IQ = 1,8).

b) Grupo controle de amostras positivas para outros vírus

O grupo composto por 25 amostras de pacientes com AIDS (12 pacientes), encefalite viral (seis pacientes), transplante de medula óssea, esclerose sistêmica, linfopitelioma de nasofaringe, algum sinal ou sintoma clínico sugestivo de encefalite (quatro pacientes), com “nested” PCR positivo para EBV, HSV, HHV6, VZV e CMV. Esses pacientes apresentaram mediana de idade de 33 anos (IQ= 8-42,5), 64% das amostras de indivíduos do sexo masculino com características de celularidade e bioquímica do LCR: 5,5 hemácias/mm³ (IQ = 1,9-23); 32 leucócitos/mm³ (IQ = 5,8-254); glicose de 56 mG/dL (IQ = 33-67); proteína 59,5 mG/dL (IQ = 39,5-161); ácido láctico 1,7 (IQ = 1,8).

3.1.2 Características celulares e bioquímicas do LCR

A análise citológica quantitativa do LCR foi realizada em câmara de Fuchs Rosenthal. A análise citológica qualitativa foi realizada colocando-se

aproximadamente 400 µl de LCR em citofunil adaptado à citocentrífuga e submetido a um programa de rotação de três minutos a 900 rpm. Após a centrifugação, o material foi corado com corante May Grünwald e visualizadas ao microscópio ótico.

Para a quantificação da glicose, utilizou-se o método da Hexoquinase/G-6-PDH. A G-6-PDH oxida a G-6-P para 6-fosfogluconato com a redução de NAD para NADH, que absorve luz a 340 nm e é detectado espectrofotometricamente. Apresenta como valores de referência de 70 a 110mg/dL (TIETZ, 1995).

Para quantificação das proteínas utilizou-se o método de vermelho de pirogalol. Em meio ácido, as proteínas com o vermelho de pirogalol e o molibdato formam um complexo colorido, cuja absorbância em 600 nm é diretamente proporcional à concentração de proteínas na amostra. Apresenta como valores de referência: para neonatos de 30 a 100mg/dL e adultos de 15 a 45 mg/dl (TIETZ, 1995).

Para quantificação do ácido láctico utilizou-se o método enzimático Lactic Acid Flex® DADE BEHRING – UK. O teste é uma modificação do método de Marbach e Weil, baseado no princípio da oxidação do lactato para piruvato. A enzima desidrogenase láctica (LDH), obtida do músculo de coelho, catalisa a oxidação do L-lactato a piruvato com simultânea redução da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD). Um mole de NAD é convertido a 1 mole de NADH. A absorbância devido à formação de NADH é diretamente proporcional à concentração de lactato, sendo mensurado por dois filtros (340-383 nm). Os valores de referência variam de 0,4 a 2mmol/l.

3.1.3 Métodos moleculares

Com o objetivo de identificar, subtipar e caracterizar os EV e HPeV utilizou-se técnicas de biologia molecular que incluíram: (1) a extração do material genético; (2) a obtenção do DNA complementar, para a pesquisa do material genético, RNA, do EV ou HPeV; (3) reação em cadeia da polimerase; (4) PCR em tempo real; (5) purificação dos produtos e (6) sequenciamento genômico (figura 6).

Objetivando a validação e a análise das medidas de sensibilidade e especificidade das metodologias, utilizou-se o ensaio de infectividade, que consistiu na inoculação de uma cepa de EV em células susceptíveis, linhagem Vero (células

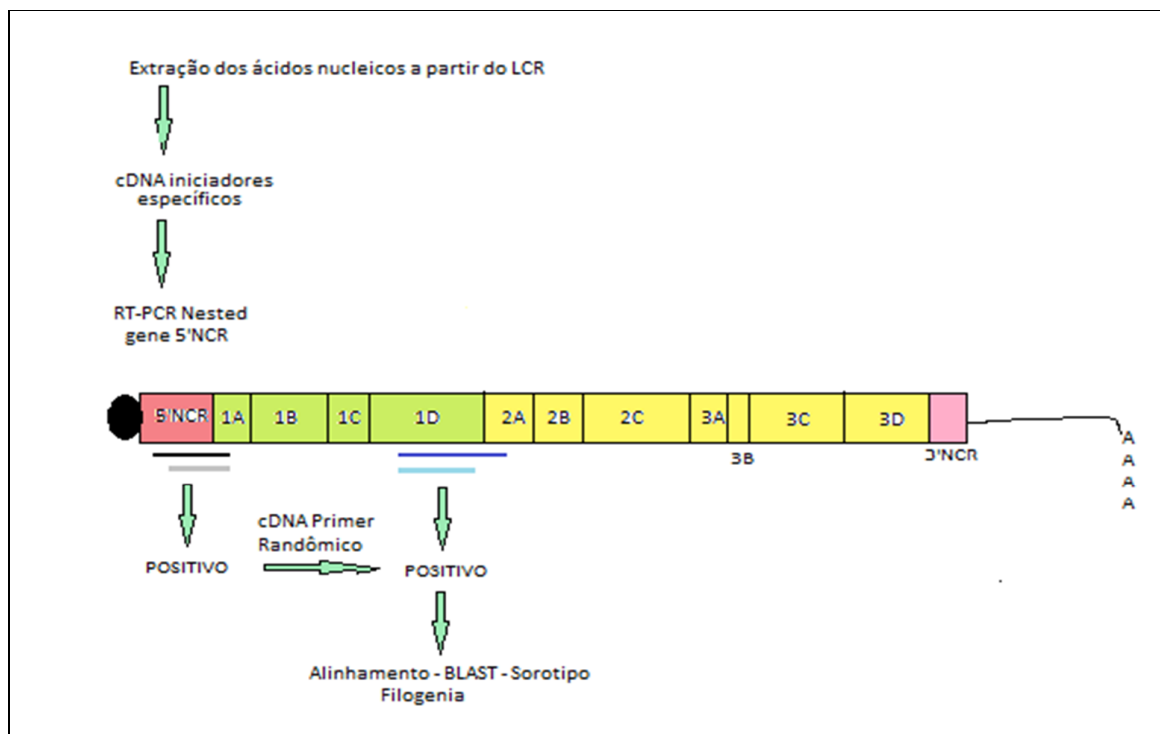


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ANÁLISE DO LCR POR BIOLOGIA MOLECULAR.

FONTE: o autor (2011).

de rim de macaco verde, abreviatura de *verda reno*, rim verde em esperanto), titulação dos vírus e análise dos sobrenadantes do cultivo celular por meio das técnicas de biologia molecular.

Além disso, foram analisados os perfis de celularidade, quantificação de proteínas, glicose e ácido láctico do LCR.

Os materiais de consumo utilizados no desenvolvimento das metodologias foram descartáveis, livres de DNases e RNases, sendo os procedimentos padronizados e desenvolvidos de acordo com os protocolos das boas práticas de laboratório de biologia molecular (TEIXEIRA; VALLE, 2000). Os protocolos padronizados e utilizados no desenvolvimento das metodologias estão relacionados no apêndice 1.

3.1.3.1 PCR Convencional

a) Extração do material genético

O RNA foi extraído utilizando-se o método descrito por Casas *et al.*, (1995) que consiste na utilização de tampão de lise contendo tiocianato de guanidina (CASAS *et al.*, 1995a, 1995b). O LCR enviado ao laboratório de virologia, aproximadamente 2 mL, sob refrigeração foi centrifugado por dez minutos, 8000 X g, à temperatura ambiente, a fim de concentrar e precipitar as células. O sobrenadante foi retirado, congelado a menos 70 °C e aproximadamente 50 µL do precipitado foi utilizado para a extração. Em tubo com capacidade para 1,5 mL livre de DNases e RNases, contendo 50 µL do LCR concentrado, foi adicionado 200 µL de tampão de lise contendo: isotiocianato de guanidina (GuSCN), Invitrogen® (EUA) 4M, 0,5% de N- laurilsarcosina, Fluka® (EUA), 1 mM de ditioneitol (DTT), Invitrogen® (EUA), 25 mM citrato de sódio, Sigma® (EUA), 20 µg/tubo de glicogênio Sigma® (EUA), 100 cópias de plasmídeo com inserto de “pseudo rabies virus” (PRV) utilizado como controle interno da reação. O tubo foi homogeneizado imediatamente e armazenado por dez minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, adicionou-se 250 µL de álcool isopropílico Merck® (EUA) conservado a menos 20 °C. Depois da homogeneização, o tubo foi centrifugado por dez minutos a 8.000 X g e 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, adicionou-se 500 µL de etanol 70% para purificação do material genético. Após precipitação e centrifugação descartou-se o sobrenadante. O tubo foi mantido aberto a 56 °C durante dez minutos para evaporação total do etanol. O sedimento obtido contendo o RNA foi ressuspensão em 22 µL de água ultrapura, previamente tratada com dipiropicrato, com o objetivo de eliminar as RNases/DNases e prevenir a degradação do RNA extraído. As extrações foram realizadas em lotes de, no máximo, dez amostras, no mesmo dia do recebimento no laboratório, sendo que para cada lote foi incluído um controle negativo e água para monitorar a contaminação.

b) Eficiência da extração

Com o objetivo de estimar a eficiência da extração, utilizou-se o sobrenadante do cultivo celular, a mesma alíquota do ensaio de infectividade. A amostra (200 μ L) foi extraída em quadruplicata, com o conjunto de reagentes de extração comercial Biopur®, considerando-se que com esta técnica a eficiência da extração foi de 100%. O conteúdo de extração obtido com o conjunto de reagentes comercial foi extraído com tampão de extração para estimar a eficiência de extração (CASAS *et al.*, 1995a).

c) Obtenção do DNA complementar com iniciadores específicos

Os vírus do gênero EV apresentam genoma RNA, sendo necessária a síntese de DNA complementar (cDNA). Para obtenção do cDNA e posterior amplificação, foi realizada a transcrição reversa após a extração, seguindo o protocolo referenciado (CASAS *et al.*, 1995b; 1997).

O sobrenadante contendo o RNA extraído foi utilizado para a transcrição reversa e obtenção do cDNA logo após a extração. A mistura dos reagentes para obtenção do cDNA foi preparada de acordo com o número de amostras extraídas em um volume de 17,5 μ L/tubo. A mistura consiste na adição de: dideoxinucleotídeos trifosfatos 2,5 mM (dNTPs), tampão concentrado cinco vezes (Invitrogen®, Life Technologies, EUA), ditioneitol (DTT) 0,1M (Invitrogen®, Life Technologies, EUA), 0,25 μ L de RNaseout (Invitrogen®, Life Technologies, EUA) e 0,25 μ L da enzima Superscript II (Invitrogen®, Life Technologies, EUA), que utiliza uma fita simples de RNA em presença de iniciadores para sintetizar a fita complementar do DNA. Inicialmente, adicionou-se 10 μ L do produto extraído e 0,5 μ L do iniciador reverso para EV. Após incubação a 94 °C por dois minutos, o tubo foi imerso imediatamente no gelo. Depois desse tempo, foi adicionado 17,5 μ L da mistura de tampões, mantendo-se o tubo em banho-maria por 45 °C durante uma hora. Foi utilizado 2,5 μ L do cDNA para o desenvolvimento da técnica de PCR. O controle negativo, água, também foi submetido à reação de transcrição reversa.

d) Amplificação do cDNA

Para a amplificação dos EV, foi utilizada a técnica de PCR descrito por Casas *et al.* (1999) com algumas modificações. Após extração do RNA a partir de 50 µL do espécime e obtenção do cDNA, o produto obtido foi submetido a amplificações, utilizando-se a metodologia de PCR. As sequências dos iniciadores estão descritas no quadro 5. A detecção se baseia na porção do gene 5'-NC, região altamente conservada na maioria dos sorotipos de enterovírus. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para validação da metodologia foram construídos por meio da análise de sequências de genoma de RNA dos diferentes sorotipos do enterovírus já sequenciados (EMBL databank, PC-Gene software; IntelliGenetics/Genofit S.A., Switzerland): polio 1 (cepa Mahoney) (KITAMURA *et al.*, 1981); polio1, polio 2 e polio 3 (sabin 1, sabin 2 e sabin 3 cepas vacinais) (TOYODA *et al.*, 1984); polio 2 cepa Lasing (LaMONICA; MERIAM; RACANIELLO, 1986); polio 2 cepa W2 (PEVEAR *et al.*, 1990); polio 3 cepa Leon 12^a1b (STANWAY *et al.*, 1984); polio 3 cepa 23127 (HUGHES *et al.*, 1986); polio 3 cepa P3/119 (CANN *et al.*, 1984); CA2 (POYRY *et al.*, 1996); CA9 (CHANG *et al.*, 1989); CA16 (POYRY *et al.*, 1996); CA21 (HUGHES *et al.*, 1989); CA24 (SUPANARANOND *et al.*, 1992); CB4 (JENKINS *et al.*, 1987); CB1 (IIZUKA *et al.*, 1987); CB3 (LINDBERG *et al.*, 1987); CB5 (ZHANG *et al.*, 1993); ECHO 12 (não publicado); e EV70 (RYAN *et al.*, 1990). Todas as amostras incluídas na pesquisa foram extraídas utilizando-se o controle interno de reação, sendo positivas na metodologia de PCR para o PRV (pseudo rabies vírus – controle interno), indicando ausência de fatores inibitórios e amplificação dos produtos extraídos após a técnica de PCR.

A PCR para EV foi baseada em “Nested PCR”. Para a primeira PCR, a mistura de reação consistiu de 10 mM Tris-HCL (pH 8.8), 3,5 mM MgCl₂, 2,5 mM KCl, 1,5 U de Taq DNA polimerase e 0,5 µL de cada um dos iniciadores externos na concentração de 10 pmol, ajustando-se o volume com água ultrapura para 22,5 µL do volume total. Em seguida, foi adicionado a 22,5 µL da mistura 2,5 µL do cDNA gerado na reação de transcrição reversa. A amplificação com o termociclador da Eppendorf® consistiu em um ciclo a 94 °C por um minuto, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 48 °C por 30 segundos, 72 °C por dois minutos, depois dos 40 ciclos, 72 °C por dez minutos, em seguida o tubo foi mantido a 4 °C.

QUADRO 5 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DA PORÇÃO 5'NC DO ENTEROVÍRUS SUAS CARACTERÍSTICAS.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência 5' – 3'	Característica
EV1 Reverso	GAAACACGGACACCAAAGTAGTCG	Iniciadores da 1º amplificação para detecção de enterovírus.
EV1 Direto	CGGTACCTTTGTRCGCCTGTTTAA	
EV2 Reverso	GGATTAGCCGCATTCAGGG	Iniciadores da 2º amplificação para detecção de enterovírus.
EV2 Direto	CAAGCACTTCTGTTTCCCCG	
PRV1 Reverso	ATGACGCCGATGTACTTCTTCTT	Controle interno da reação (<i>pseudo rabies vírus</i>) 1º amplificação.
PRV1 Direto	CGCGTGGTCTACGGGGACACGGA	
PRV2 Reverso	CCGGAAGGTCTTCTCGCACTC	Controle interno da reação (<i>pseudo rabies vírus</i>) 2º amplificação.
PRV2 Direto	GGGACACGGACTCGGTCTCC	

FONTE: adaptado de Casas *et al*(1999).

Procedeu-se a segunda PCR, 0,5 µL do produto da primeira amplificação foram transferidos para 24,5 µL da mistura de reação como descrito anteriormente, alterando a quantidade da Taq polimerase utilizada na quantidade de 0,25 µL. Os tubos foram submetidos à termociclagem de um ciclo de 94 °C por dois minutos, três ciclos de 94 °C por 30 segundos, 52 °C por 30 segundos, 72 °C por um minuto, após os 30 ciclos, 72 °C por dez minutos, no final da termociclagem os tubos foram mantidos a 4 °C. Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose após a diluição de 5 µL do produto, 4 µL de água e 1 µL do tampão de aplicação concentrado dez vezes contendo: 1 ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0), 2,5 mL de glicerol (50%), 0,025 g de azul de bromofenol (0,5%). Realizou-se a eletroforese em gel de agarose na concentração de 1 % em solução TBE diluído uma vez, contendo 108 g de Tris Base (890 mM), 55 g de ácido bórico (890 mM), 40 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 (20 mM) e brometo de etídeo (0,5 µg/mL) por 60 minutos a uma diferença de potencial de 100 Volts. Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado com água destilada para retirar o excesso de brometo de etídeo e observado no sistema de

fotodocumentação contendo luz UV. Controles negativo e positivo foram incluídos a fim de monitorar as reações de transcrição reversa, amplificação e contaminação. O tamanho esperado das bandas em pares de base (pb) foi de 306-316 pb para o enterovírus e para o controle interno 147pb. No apêndice 1 apresenta-se a tabela contendo os dados das metodologias aplicadas para as 440 amostras.

3.1.4 PCR em tempo real

a) Extração do RNA

Para a técnica de PCR em tempo real a extração do material genético foi realizada por meio do conjunto de reagentes de extração EXTRAgen® Nanogen, Itália, de acordo com a técnica descrita pelo fabricante. Os reagentes inclusos no conjunto compreendem: tampão de extração, reagente de precipitação contendo etanol, reagente de lavagem e água ultrapura. Transferiu-se 300 µL da amostra para o tubo contendo 800 µL do tampão de extração e adicionou-se 10 µL controle interno (CPE-RNA). O tubo foi submetido à homogeneização imediatamente, por cinco segundos, e incubou-se em temperatura ambiente por cinco minutos. Após a incubação, o tubo foi centrifugado por cinco segundos à temperatura ambiente por 8.000 X g e posteriormente incubado por dez minutos em termobloco a 80 °C. Após esse período, o tubo foi centrifugado em temperatura ambiente por 15 minutos a 8.000 X g. Transferiu-se 900 µL do sobrenadante para 500 µL do tampão de precipitação, o tubo foi homogeneizado por inversão e posteriormente centrifugado em temperatura ambiente por dez minutos a 8.000 X g. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL do tampão de lavagem ao precipitado de ácido nucléico. Foi homogeneizado por inversão e centrifugou-se por um minuto em temperatura ambiente, por aproximadamente 8.000 X g. Descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se por aproximadamente 8.000 X g, retirando-se totalmente o sobrenadante. O tubo contendo o precipitado foi incubado por cinco minutos, em temperatura ambiente e diluído com 15 µL de água ultrapura.

b) Obtenção do DNA complementar com iniciadores randômicos

Para obtenção do cDNA e posterior amplificação, foi realizada a transcrição reversa após a extração, seguindo o protocolo RT – Kit Plus®, da Nanogen, Itália. A transcrição foi realizada utilizando-se iniciadores randômicos hexâmetros (PdN6) a partir de 10 µL do RNA. As enzimas MMLV-RT na concentração de 200 U/µL e RNasin na concentração de 40 U/µL foram diluídas com água ultrapura, de acordo com o número de amostras para cDNA. Para cada 5 µL da mistura de enzimas adicionou-se 10 µL do RNA e 10 µL do RT-mix, os tubos foram mantidos no termociclador a 37 °C por 90 minutos e a 95 °C por cinco minutos. O mesmo procedimento foi realizado para os controles positivos e negativos. Após esse tempo, 5 µL do cDNA foi utilizado para reação de PCR em tempo real.

c) PCR em tempo real

Utilizou-se a metodologia de PCR em tempo real, ENTEROVÍRUSQ – PCR Alert AmpliMIX, Nanogen Advanced Diagnostics®, Itália, para detecção e quantificação do cDNA do EV obtido após extração e transcrição reversa. O ensaio consistiu na amplificação e quantificação do DNA complementar do EV, sorotipos: poliovírus 1 – 3, coxsackie virus A1 – A22 e A24, coxsackie virus B1 – B6, echovirus 1 – 9, 11 – 21, 24 – 27 e 29 – 33, EV 68 – 71. O ensaio não detecta HPeV previamente. O procedimento envolve uma reação de amplificação em microplaca utilizando-se um termociclador que possui um sistema ótico fluorescente de detecção, Applied Biosystems ABI PRISM TM 7000, EUA.

A metodologia consiste em uma reação de amplificação específica para a região do gene do EV 5' NC e da região do genoma do fago MS2, utilizado como controle interno da reação. A sonda fluorescente está ligada ao fluoróforo FAM e inativada pelo MGB-NFQ específico para detecção do gene 5' NC. A sonda MS2 está complexada ao fluoróforo VIC e inativada pelo MGB-NFQ e é específica para a região do genoma RNA do fago MS2. Os fluoróforos FAM e VIC são ativados quando hibridizados com os produtos específicos. A emissão de fluorescência aumenta à medida que o produto da amplificação aumenta. A mistura de reagentes, AmpliMIX, inclui um sistema de tampão, cloreto de magnésio, os nucleotídeos

trifosfato, o fluoróforo ROX, como referência passiva para a normalização da fluorescência, a enzima Uracil N-glycosidase (UNG), para prevenir a contaminação do produto amplificado, a enzima Taq DNA polimerase e a adição da AmpliProbe. A extração do RNA do EV foi realizada de acordo com a técnica descrita no item (a). A transcrição reversa foi realizada utilizando-se a técnica descrita no item (b) com a substituição do iniciador específico reverso pelo iniciador randômico. Para validação da metodologia, utilizou-se o CPE – RNA® – Controle Interno – Nanogen, Italia, Enterovírus – Positive Control®, Nanogen, Itália, plasmídeo utilizado como controle positivo e o ENTEROVÍRUSQ – PCR Standard® – Nanogen, Itália, padrões com quantidades conhecidas de cDNA do enterovírus, 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 utilizados para obtenção da curva padrão.

Para o desenvolvimento da metodologia, realizou-se a mistura de reagentes AmpliMIX®, AmpliMASTER® e AmpliPROBE®, à 20 µl da mistura de reação adicionou-se 5 µl do DNA das amostras, controles positivo e negativo e os padrões. A placa foi submetida ao ciclo de termociclagem de: 50 °C por dois minutos, 95 °C durante dez minutos, 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto. A metodologia apresenta uma sensibilidade de 10 a 1.000.000 de cópias de cDNA por reação e 625 a 62.500.000 genomas equivalentes por mililitro. No apêndice 3 apresenta-se a tabela contendo os dados das metodologias aplicadas para as 440 amostras.

3.2 ENSAIO DE INFECTIVIDADE

Com o objetivo de estabelecer a sensibilidade analítica da metodologia de RT-PCR para detecção do genoma porção 5' NC do ENTEROVÍRUS, foi utilizado o ensaio de infectividade para detecção do título viral, que foi expresso por unidade formadora de placa de lise por mililitro (PFU/mL) (DESPRÈS; FRENKIEL; DEUBEL, 1993).

Em placa de cultivo celular de 24 poços, semeou-se 1×10^5 células de rim de macaco verde (VERO) por poço, essas foram mantidas em estufa a 33 °C até a completa aderência das células. Os vírus a serem titulados, obtidos de sobrenadante de cultivo celular, foram diluídos seriadamente (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) em tubos, utilizando-se meio de cultura Minimal Essential Medium – Eagle Earle (MEM),

Sigma®, EUA, contendo estreptomicina (1.000 unidades) e sem soro bovino fetal (SBF) em um volume final de 1 ml. Infectou-se a placa em duplicata e com MOCK, controle negativo, 400 µl por poço durante uma hora a 33 ° C. Retirou-se o inóculo e adicionou-se 500 µl de meio composto por partes iguais de meio MEM, concentrado 2X, 10% de SBF e 3,2% de carboximetilcelulose (CMC). Incubou-se a placa na temperatura específica por cinco dias. Após esse período, retirou-se o CMC/SBF/MEM. As células foram lavadas três vezes com PBS, fixadas com 500 µl de paraformaldeído (PFA) 3% em PBS, pH 7,2 por 20 minutos em temperatura ambiente, após fixação, as células foram lavadas novamente três vezes com PBS. Então, adicionou-se 200 µl de solução de cristal violeta por poço, incubou-se a placa a temperatura ambiente por 20 minutos, foi lavada com água corrente e seca. Para interpretação, escolheu-se a duplicata da diluição de melhor visualização das placas. Aplicou-se a fórmula:

$$\text{PFU/mL} = \text{média do n}^\circ \text{ de placas} \times \text{diluição} \times \frac{1}{0,4 \text{ mL (Volume do Inóculo)}}$$

3.3 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

3.3.1 Metodologia

A metodologia descrita por Oberste *et al.* (1999b) foi utilizada para amplificação do gene relacionado à porção VP1 do EV, desde que os sítios de neutralização residem na VP1 e estão relacionados com os sorotipos. As amostras foram submetidas à extração pelas técnicas já descritas no item 3.1.3.1 (a) p.62. Para a síntese do cDNA, foi utilizada a técnica de transcrição reversa descrita no item 3.1.4 (b) p. 68 com o iniciadores randômicos. Para amplificação por meio da técnica de PCR, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores relacionados à porção do gene VP1 do EV, relacionados no quadro 6. Após a amplificação, o volume total do produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etidium, a uma ddp de 100 V, por 45 minutos. O produto obtido foi purificado do gel de agarose e sequenciado, utilizando-se o conjunto de reagentes ABI PRISM™

BigDye Cycle Sequencing (Applied Biosystems Inc., CA). Utilizou-se para cada amostra 2 µl do Big Dye Terminator (Applied Biosystems Inc., CA), 3 µl de tampão cinco vezes concentrado, água ultrapura q.s.p. 20 µL, 0,32 µl dos iniciadores direto ou reverso na concentração de 10 µM e 5 µL do produto de PCR purificado. A reação de sequenciamento foi realizada no ABIPRISM Sequencer® (Applied Biosystems Inc., CA), inicialmente a 96 °C por um minuto, 40 ciclos de: desnaturação 96 °C por 45 segundos, anelamento 50 °C por 30 segundos e extensão de 60 °C por quatro minutos. Para a caracterização molecular e análise filogenética, utilizou-se o programa de análise de nucleoproteínas do NCBI Blast, o programa BioEdit e Mega4 (NEI & KUMAR, 2000).

QUADRO 6 – OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE SEQUENCIAMENTO E SUAS CARACTERÍSTICAS.

Nome do oligonucleotídeo	Sequência 5' – 3'	Gene	Posição no genoma
012	ATGTAYGTICCCICGIGG	VP1	2875-2894
040	ATGTAYRTICCIMCIGGIGC	VP1	2905-2924
011	GCICCGAYTGITGICCRAA	2 ^a	3311-3292

FONTE: adaptado de Oberste *et al.* (1999b; 2003).

3.3.2 Filogenia

Do total das amostras positivas, foi possível realizar o sequenciamento de 12 amostras, as quais foram alinhadas e comparadas com sequências do banco de genes por meio do programa BLAST. As similaridades encontradas definiram os tipos dos EV ou HPeV. Os alinhamentos mais consistentes foram utilizados para os métodos filogenéticos. Inferiu-se relações filogenéticas por meio do programa Mega4, as árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se os programas Neighbor-Joining e Verossimilhança. Os números para depósito no banco de genes das amostras originais será: BR2006-767-4, BR2006-6-4, BR2006-163-30, BR2006-60-30, BR2006-61-30, BR2006-540-30, BR2006-164-30, BR2006-897-HPeV, BR2006-699-HPeV, BR2006-820-HPeV, BR2006-175-HPeV, BR2006-186-HPeV.

Os números de acesso das amostras-referência são:

As sequências-referência reportadas por Oberste *et al.* (1999b) utilizando os pares de iniciadores são: AF081595 - AF081645.

ECHO30 (AY736189.1, AY701745.1, AY603474.1, AY601758.1, AY601884.1, AY601757.1, AY603474.1, AJ430701.1, AF391933.1, AF391941.1, AF391938.1, AF391937.1, AF236564.1, AM946174.1, AB218632.1, EU678969.1, EU678968.1, EU678967.1, EU678966.1, EU678965.1).

ECHO4 (AM236919.1, AF081643.1, AF233373.1, AB268167.1, AF446127.1).

HPeV (ECHO AMS721, EF155422.1, GQ183021.1, FJ373154.1, HQ696570.1, HQ696577.1, HQ696574.1, HQ696572.1, HQ696571.1, AJ005695.1, DQ315670.1, HQ897630.1, HQ163891.1, HQ163887.1, HQ163888.1, HQ163884.1).

Para classificação molecular dos echovirus 30 ou 4 analisou-se a diversidade genética e aspectos moleculares por meio do sequenciamento parcial da região codificadora do gene VP1 (390 pb) de cinco amostras do estudo. Foram consideradas similaridades maiores que 97% na pesquisa do banco de genes. A árvore filogenética foi construída utilizando-se o método da Máxima Verossimilhança, com isolados de vários países, inclusive o Brasil.

Para classificação molecular dos parechovírus, foi utilizada a mesma estratégia das outras análises. As similaridades encontradas foram de, aproximadamente, 97 a 100% com a sequência referência. A árvore filogenética foi construída utilizando-se o método da Máxima Verossimilhança, com isolados dos diferentes grupos do parechovírus 1 – 6.

3.4 GEOPROCESSAMENTO

Com o objetivo de mapear as meningites virais e avaliar os riscos à saúde, utilizou-se um conjunto de técnicas computacionais para manipulação de informações espacialmente referidas de acordo com o relato de Bonato e Yano (2006). Foram usados os programas computacionais TabWin, desenvolvido pelo Ministério da Saúde e obtido no portal <<http://www.saude.gov.br>>, e TerraView (BRASIL, 2007). O mapa de Curitiba foi selecionado como unidade espacial e está dividido por bairros, selecionaram-se como indicadores: os índices de incidência por

100.000 habitantes, amostras de LCR coletadas no período do estudo e RT-PCR positivas e meses de ocorrência (representadas por formas geométricas coloridas).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram digitados em planilha eletrônica Excel da Microsoft Windows® e essa base de dados foi utilizada para a análise estatística por meio do programa estatístico GraphPad Prism®. Os dados foram descritos por mediana, intervalo interquartis. A base de dados foi importada e analisada por meio de testes não paramétricos “t” testes, ANOVA, e as frequências calculadas por meio de testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. Para as análises de sequenciamento genômico, as sequências foram editadas por meio do editor BioEdit Sequence Alignment Editor Copyright®, versão 7.0.5.3, 1997-2005 (HALL, 1999). Após a edição das sequências, essas foram comparadas com sequências do banco de genes por meio do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), do National Center Biotechnology Informations (NCBI). As similaridades encontradas definiram os sorotipos dos enterovírus, após alinhamento das sequências, deu-se o estudo filogenético. Inferiu-se relações filogenéticas por meio do programa Mega4, as árvores filogenéticas foram construídas utilizando-se os programas Neighbor-Joining e Verossimilhança.

Para o cálculo das características operacionais dos métodos de biologia molecular, utilizou-se porcentagens de concordância e discordância, sensibilidade ($VP / VP + FN \times 100$), especificidade ($VN / VN + FP \times 100$), valor preditivo positivo ($VP / VP + FP \times 100$), valor preditivo negativo ($VN / VN + FN \times 100$), taxa de falso positivo ($100 - VPP$), valor presuntivo positivo ($VP + FP / \text{total de amostras}$), razão de detecção ($VP / \text{total de amostras}$), índice de Youden [(sensibilidade + especificidade) – 1], razão de erro ($FP + FN / \text{total de amostras}$), erro combinado ($FP + FN / \text{total de amostras}$), razão de verossimilhança positiva (sensibilidade / 1 – especificidade), razão de verossimilhança negativa ($1 - \text{sensibilidade} / \text{especificidade}$) e índice Kappa.

4 RESULTADOS

4.1 PACIENTES

Entre os anos de 2005 e 2006 foram incluídas no estudo 440 amostras de LCR, o apêndice 2 apresenta a tabela com os dados demográficos dos pacientes e a figura 7 apresenta o algoritmo para a análise das amostras do grupo de estudo e grupos controle. Do total das amostras, 49/440 (11%) foram positivas para os EV/HPeV e 391 (89%) amostras apresentaram resultados negativos. No ano de 2005, 6/108 (5,5%) amostras coletadas foram positivas para EV/HPeV, e no ano de 2006, 43/332 (12,9%) foram positivas (figura 8). Observou-se um maior número de amostras coletadas nos períodos em que ocorreu maior frequência de amostras positivas.

O EV/HPeV foram observados em todas as idades abaixo de 30 anos, com maior número de amostras positivas entre 7 a 14 anos e 4 a 6 anos (figura 9). O número total de amostras positivas ($n = 49$) ou negativas ($n = 391$) foi significativamente maior para os intervalos de 7 a 14 anos (41 / 33%), 4 a 6 anos (29 / 33,5%) ($p = 0,04$) e para o HPeV todas as amostras ocorreram nos intervalos de 7 a 14 anos (tabela 1). A média de idade dos pacientes positivos e negativos foi de 6,2 anos e 6,5 anos, respectivamente. Em uma amostra de uma paciente de 3 meses foi detectada coinfeção por EV e EBV.

Do total de amostras negativas ($n = 391$), 232 (59%) eram provenientes de pacientes masculinos e 159 (41%) de pacientes femininos ($p = 0,6677$). As amostras positivas ocorreram em 27 (55%) pacientes masculinos e 22 (45%) pacientes femininos.

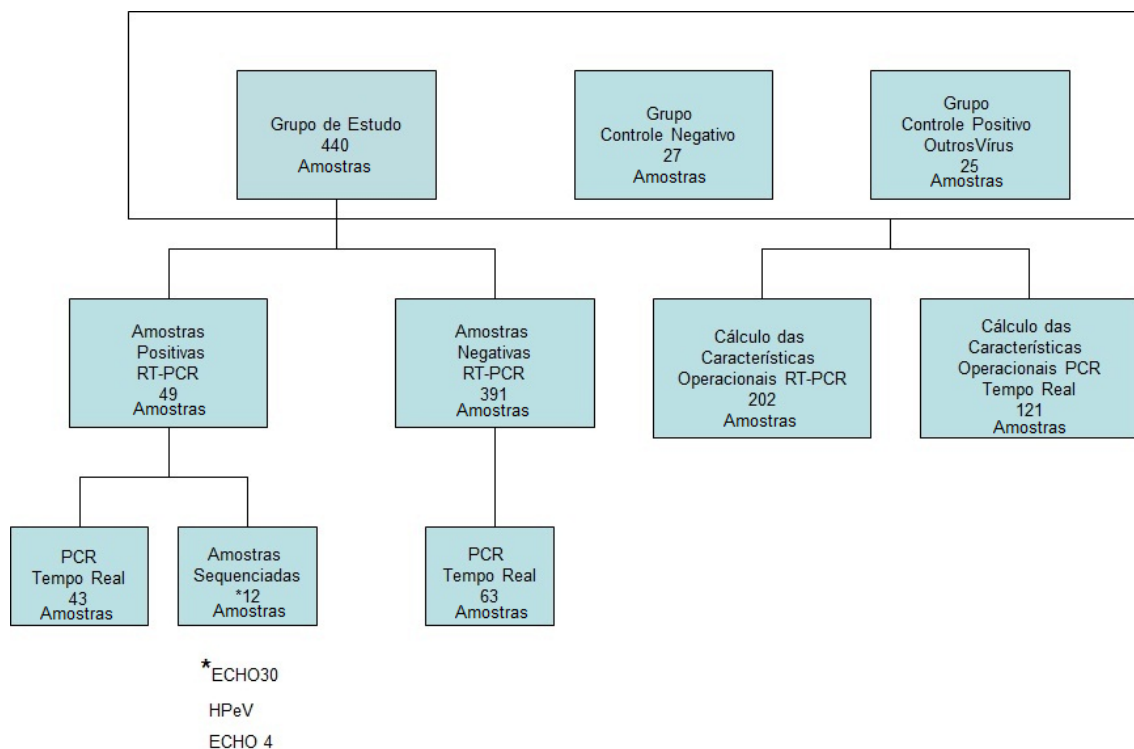


FIGURA 7 – ALGORITMO DA ANÁLISE DAS AMOSTRAS DO GRUPO DE ESTUDO E GRUPOS CONTROLE NEGATIVO E POSITIVO PARA OUTROS VÍRUS
FONTE: o autor (2011)

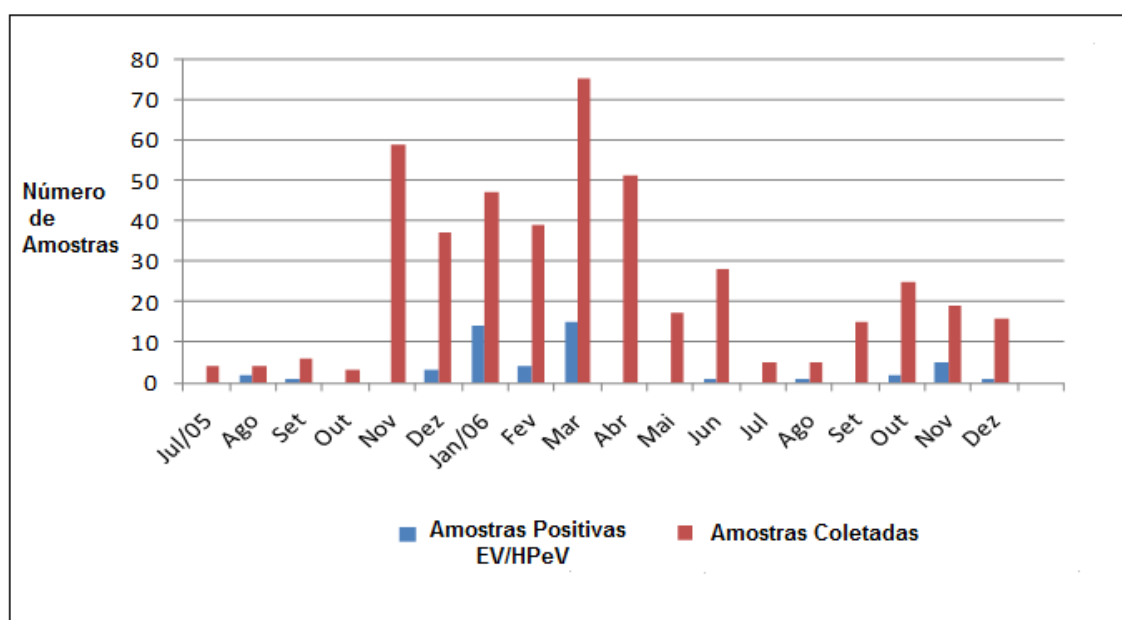


FIGURA 8 – TOTAL DE AMOSTRAS COLETADAS E POSITIVAS POR RT-PCR PARA EV/HPeV NO PERÍODO DO ESTUDO, 2005 à 2006.
FONTE: o autor (2011).

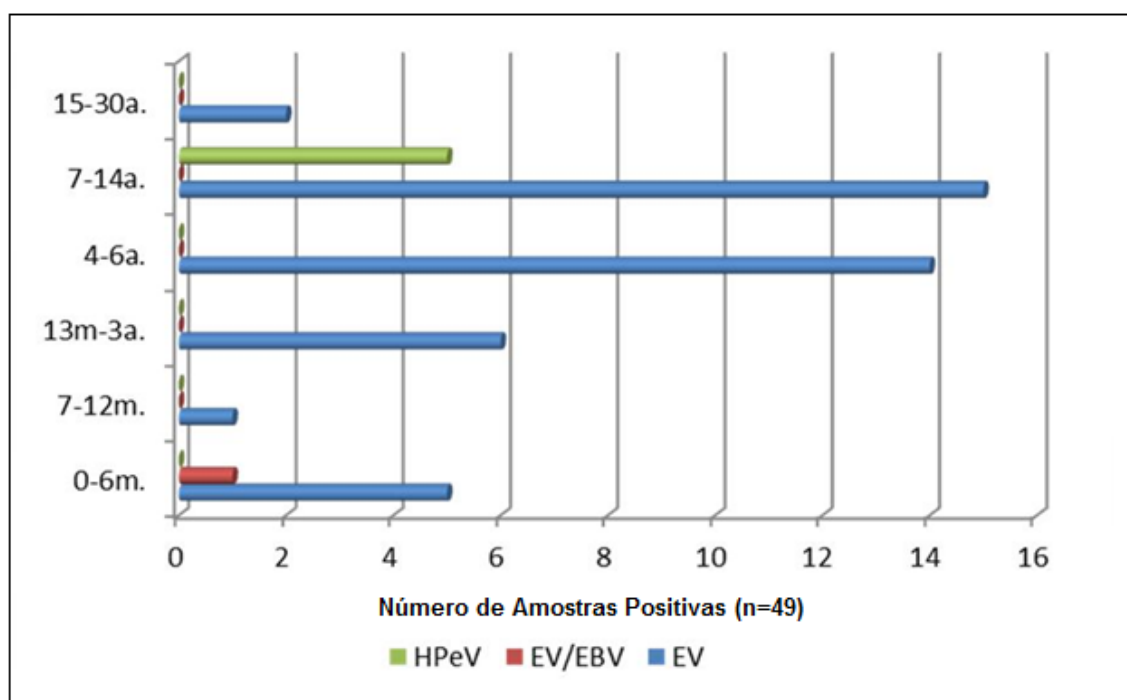


FIGURA 9 – DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA EV E HPeV SELECIONADAS POR IDADE.

FONTE: o autor (2011).

LEGENDA: a = anos; m = meses; EV/EBV coinfeção por enterovírus e vírus Epstein Barr

TABELA 1 – INTERVALO DE IDADES DOS PACIENTES POSITIVOS E NEGATIVOS PARA EV E HPeV.

	Amostras Positivas EV/HPeV (n = 49)	Amostras Negativas (n = 391)
0-6 m.	6(12%)	15(4%)
7-12 m.	1(2%)	37(9,5%)
13 m–3a.	6(12%)	67(17%)
4-6 a.	14(29%)	132(33,5%)*
7-14 a.	EV 15(31%) HPeV 05(10%)	127(32,5%)*
15-30 a.	2(4%)	10(2,5%)
>30 a.	0	3(1%)

Mann Whitney *p=0,04

FONTE: o autor (2011).

LEGENDA: m = meses; a = anos.

4.2 CARACTERÍSTICAS CELULARES E BIOQUÍMICAS DO LCR

4.2.1 Pacientes negativos

Linfócitos foram os tipos celulares predominantes, a mediana (10%) de neutrófilos foi menor em relação aos pacientes positivos com mediana de (23%), porém, sem significância estatística. As taxas de proteína para esses pacientes foram relativamente mais altas ($p = 0,0730$) (tabela 2).

Amostras de LCR com resultados negativos apresentaram um número elevado de hemácias, com uma média de 591 células/mm³, quando comparadas com as amostras com resultados positivos, que apresentaram uma média de 39 células/mm³, sendo esse resultado estatisticamente significativo ($p = 0,0027$).

4.2.2 Pacientes positivos

Os dados laboratoriais como contagem diferencial de células, análise bioquímica, quantificação de proteínas totais e glicose, nos pacientes positivos para EV ou HPeV, variaram amplamente, conforme a tabela 2. Linfócitos foram os tipos celulares predominantes, com mediana de 99% e IQ (25-75%) 90-99%. As medianas das quantificações de glicose e proteínas totais foram de 40 e 62 mg/dL, respectivamente. As dosagens de ácido láctico foram menores que 3,0 mg/dL em todos os pacientes.

TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DAS AMOSTRAS DE LCR RT-PCR NEGATIVAS E POSITIVAS PARA EV/HPeV.

	LCR RT-PCR Negativos (n=391)		LCR RT-PCR Positivos (n=49)		P*
	Mediana	IQ (25-75%)	Mediana	IQ (25-75%)	
Hemácias (cel/ mm ³)	5	1-48	1,3	0-11	0,0027
Leucócitos (cel/ mm ³)	80	24-181	84	14-183	0,6278
Neutrófilos (%)	10	4-30	23	4-38	0,6833
Linfócitos (%)	99	87-100	99	90-99	0,0851
Monócitos/macrófagos (%)	1	1-9	1	1-4	0,3520
Proteína (mG/dL)	44	32-62	40	26-52	0,0730
Glicose (mG/dL)	62	57-70	62	53-73	0,8797
Ácido láctico (mmol/L)	2,1	1,8-2,4	2,0	1,8-2,4	0,4772

Mann-Whitney p < 0,005

FONTE: o autor (2011).

LEGENDA: LCR – líquido cefalorraquidiano; IQ – intervalo interquartil

4.3 OCORRÊNCIA DE CASOS POSITIVOS PARA EV/HPEV EM RELAÇÃO À TEMPERATURA MÉDIA MENSAL E ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO

A figura 10 apresenta a distribuição dos casos positivos no período do estudo em relação à temperatura média mensal e índice pluviométrico. Observa-se um maior número de amostras positivas nos meses com temperaturas mais elevadas e que coincidem com as estações de verão (21 de dezembro a 20 de março) e primavera (23 de setembro a 21 de dezembro), porém, casos esporádicos foram observados nos outros meses. No ano de 2006, o número de amostras positivas também ocorreu quando o índice pluviométrico foi mais elevado.

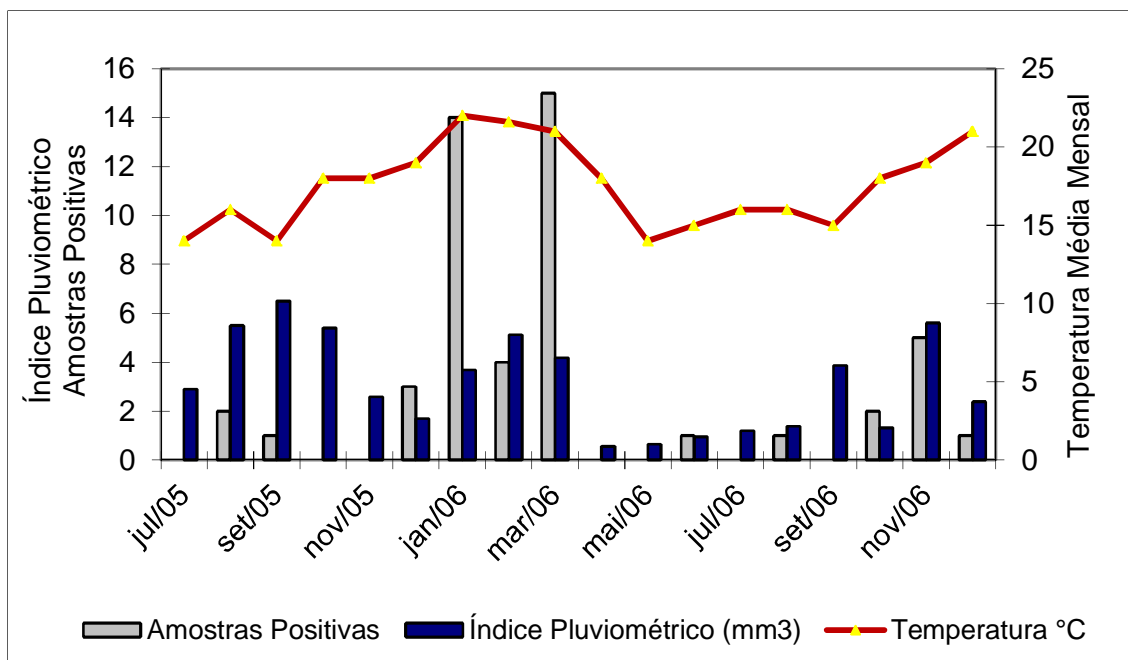


FIGURA 10 – DISTRIBUIÇÃO MENSAL DE AMOSTRAS POSITIVAS POR RT-PCR PARA EV/HPeV NO PERÍODO DO ESTUDO EM RELAÇÃO À TEMPERATURA MÉDIA MENSAL E ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO.

FONTE: o autor (2011).

4.4 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE LCR POR RT-PCR

Quarenta e nove amostras (11,1%) apresentaram sinais compatíveis com os tamanhos de produtos esperados, 306-316 pb e 147 pb para o controle interno, em gel de agarose, marcado com brometo de etídeo (figura 11). Os controles negativo

(água ultrapura), positivo (306-316 pb) e internos (147 pb) foram adequadamente amplificados (figura 11), em todos os 74 géis de agarose. A extração realizada pelo método de Casas *et al.*, resultou em uma eficiência de extração de 69%, após análise realizada como descrito no item 3.1.3.1, (b), p. 62.

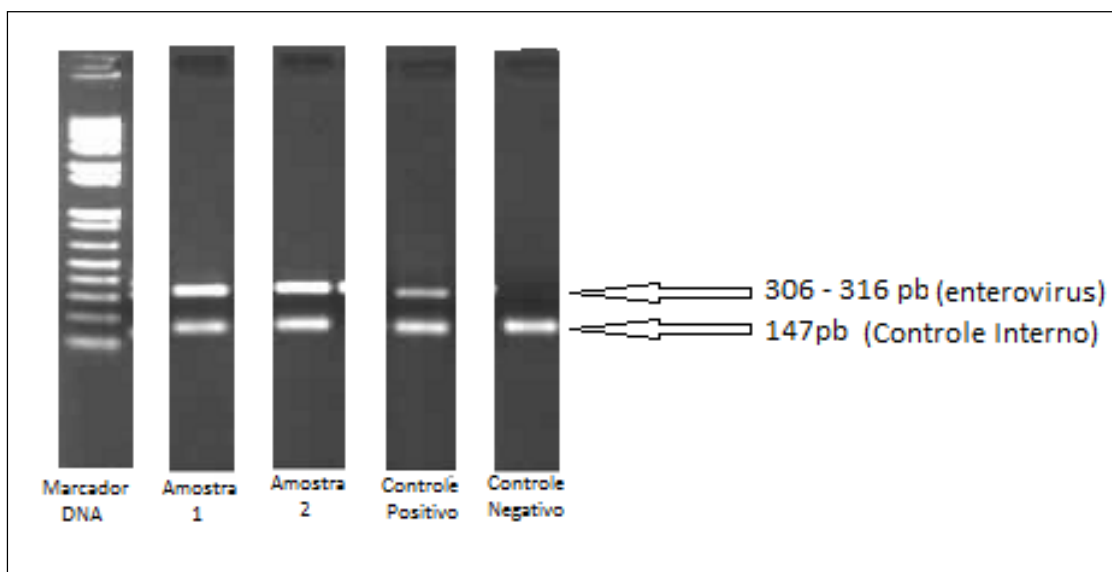


FIGURA 11 – TAMANHO DOS PRODUTOS OBTIDOS APÓS RT-PCR PARA EV/HPeV, AMOSTRAS TESTADAS, CONTROLES POSITIVO, NEGATIVO E INTERNO.

FONTE: O autor (2011).

LEGENDA: linha 1 – peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen®); linhas 2 e 3 – amostras EV positivas (306–316pb), com controle interno (147pb); linha 4 – controle positivo e controle interno positivo; linha 5 – controle negativo com controle interno positivo.

4.5 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE LCR POR PCR EM TEMPO REAL

Um total de 158 amostras de LCR foi avaliado em paralelo por RT-PCR e PCR em tempo real e agrupadas de acordo com a positividade por RT-PCR. Amostras com resultados positivos por RT-PCR: 43 amostras foram analisadas, sendo 41 (95%) com genomas detectados por PCR em tempo real, que apresentaram gráficos como o observado na figura 12; duas amostras não foram amplificadas. Amostras com resultados negativos para RT-PCR: analisaram-se 63 amostras e em 44 (70%) foram detectados genomas de EV/HPeV. O grupo controle negativo incluiu 27 amostras, 26 com resultados não detectados e 1 com resultado detectado por PCR em tempo real e RT-PCR. Amostras com resultados para EV negativos por RT-PCR e com resultados positivos por PCR convencional para outros

vírus (HSV, CMV, EBV, HHV6) incluíram 25 amostras, sendo 23 (92%) genomas não detectados e dois detectados. Foram analisadas as diferenças da carga viral por mL de LCR e \log_{10} entre os grupos analisados por PCR em tempo real. Os resultados foram expressos em mediana, intervalo interquartil e p , e estão representados no quadro 7. Observa-se que há uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre os diferentes grupos. Observa-se que as amostras com resultados negativos por RT-PCR apresentaram cargas virais expressas em cópias/mL e \log_{10} mais baixas por PCR em tempo real.

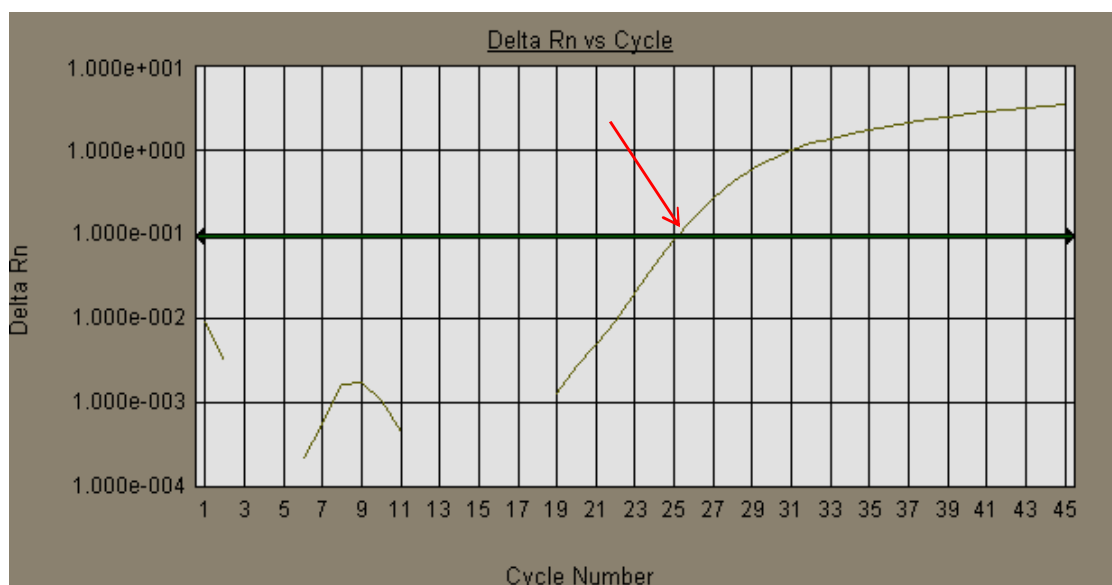


FIGURA 12 – GRÁFICO REPRESENTANDO RESULTADO DE PCR EM TEMPO REAL DE UMA AMOSTRA POSITIVA DO ESTUDO.

FONTE: O autor (2011).

LEGENDA: flecha indicando o Ciclo "Treshold" (CT) da amostra.

QUADRO 7 – ANÁLISES DAS AMOSTRAS DE LCR POSITIVAS E NEGATIVAS POR RT-PCR E PCR EM TEMPO REAL.

	Amostras RT-PCR Positivas (n=43)		Amostras RT-PCR Negativas (n=63)		Grupo Controle Negativo (n=27)	Grupo Controle Outros Vírus (n=25)
Amostras Positivas PCR tempo real	41		44		1	2
	Mediana	IQ (25-75%)	Mediana	IQ (25-75%)	Mediana IQ (25-75%)	Mediana IQ (25-75%)
CV cópias/mL	46.600	10.820-212.000	1.439	0-14.200	0	0
Log ₁₀	4,8	4,1-5,4	3,2	0-4,1	0	0

Mann Whitney p < 0,0001

FONTE: o autor (2011).

LEGENDA: RT-PCR = transcrição reversa seguida de PCR;

DP = desvio padrão;

IQ = intervalo interquartil;

CV = carga viral;

Log₁₀ = Logaritmo na base 10.

4.5.1 Concordância entre as metodologias de RT-PCR e PCR em tempo real

No quadro de contingência (quadro 8) apresentam-se os níveis de concordância e discordância entre os resultados avaliados pelas metodologias de RT-PCR e PCR em tempo real. O índice Kappa foi de 0,417, indicando que houve uma concordância moderada entre os métodos. Para esta análise utilizou-se 158 amostras que incluíram os grupos de amostras: que apresentaram resultados positivos por RT-PCR e PCR em tempo real, amostras negativas por RT-PCR e grupos controle.

QUADRO 8 – COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DAS METODOLOGIAS DE RT-PCR E PCR EM TEMPO REAL PARA EV/HPeV.

PCR tempo real/ RT-PCR	Detectado	Não detectado	Total
Positivo	42	2	44
Negativo	46	68	114
Total	87	70	158

Qui-Quadrado $p < 0,0001$

Nota: % de concordância = 70 %; % de discordância = 30 %; Índice Kappa = $0,417 \pm 0,070$ Intervalo de Confiança 95% (0,280 - 0,554); Concordância moderada

FONTE: o autor (2011).

4.5.2 Características operacionais do RT-PCR

Para determinação das características operacionais da metodologia de RT-PCR, definiram-se os grupos de doentes como descrito no item 3.1.1.1, p. 58. As características operacionais da metodologia de RT-PCR estão demonstradas no quadro 9.

QUADRO 9 – ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DA METODOLOGIA DE RT-PCR.

	Positivo	Negativo	Total
Doentes	24	126	150
Não doentes	03	49	52
Total	27	175	202

Nota: Sensibilidade=16%; Especificidade=94%; Valor preditivo positivo=89%; Valor preditivo negativo=28%; Taxa de falso positivo=11%; Valor presuntivo positivo=13%; Razão de detecção=0,12; Índice de Youden=10%; Razão de erro=5,4%; Erro combinado=0,64; Razão de verossimilhança positiva=2,7; Razão de verossimilhança negativa=0,06.

4.5.3 Características operacionais da metodologia de PCR em tempo real

No RT-PCR convencional foi obtido 11,13% de amostras positivas e por PCR em tempo real a positividade foi de 70%. As características de sensibilidade do teste de PCR em tempo real comparado ao RT-PCR, entre outras, estão demonstradas no quadro 10.

QUADRO 10 – ANÁLISE DAS CARACTERÍSTICAS OPERACIONAIS DA METODOLOGIA DE PCR EM TEMPO REAL.

PCR Tempo Real	Positivo	Negativo	Total
Doentes	56	13	69
Não doentes	03	49	52
Total	59	62	121

Nota: Sensibilidade=81%; Especificidade=94%; Valor preditivo positivo=95%; Valor preditivo negativo=79%; Taxa de falso positivo=5%; Valor presuntivo positivo=49%; Razão de detecção=0,46; Índice de Youden=75%; Razão de erro=0,3%; Erro combinado=0,13; Razão de verossimilhança positiva=13,5; Razão de verossimilhança negativa=0,2.

4.6 ENSAIO DE INFECTIVIDADE

A diluição seriada do sobrenadante de cultura de EV em \log_{10} demonstrou uma dinâmica de desenvolvimento de placas de lise como apresentado na figura 13. O ensaio realizado em quadruplicata apresentou uma média de placas de 12 placas na diluição de 10^{-5} . Aplicando-se a fórmula detalhada em material e métodos se obtém o resultado de 3×10^6 placas de lise/mL.

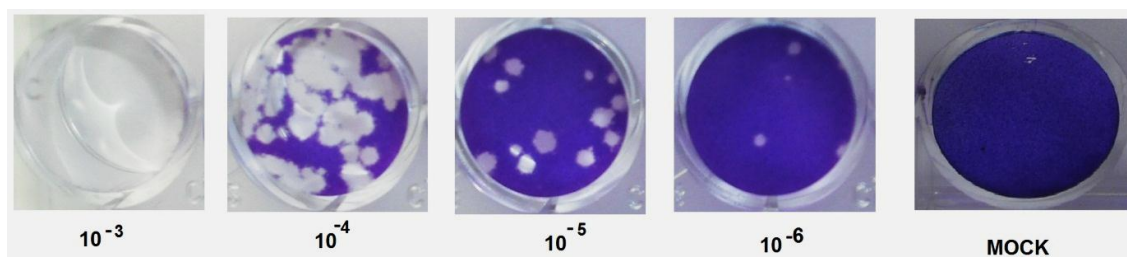


FIGURA 13 – DEMONSTRAÇÃO DA FORMAÇÃO DE PLACAS DE LISE EM CÉLULAS VERO PELO ENTEROVÍRUS.

FONTE: O autor (2011).

LEGENDA: MOCK = controle negativo.

As diluições seriadas foram avaliadas por meio do ensaio de PCR em tempo real. A menor diluição, fator 10, corresponde ao ciclo limiar (CT) de 15,25, com uma quantificação de 3×10^6 cópias de cDNA/reacção, enquanto que a maior diluição corresponde ao CT de 31,00, com uma quantificação de 74 cópias de cDNA/reacção (tabela 3). Sendo definida a sensibilidade analítica do ensaio de RT-PCR de 40 cópias de cDNA/reacção

TABELA 3 – DINÂMICA DA REACÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL E DILUIÇÕES SERIADAS DO SOBRENADANTE DE CULTURA DE ENTEROVÍRUS.

Diluição seriada	PFU	CT (FAM)	Cópias de cDNA/reacção	Genomas equivalentes/reacção
1×10^{-2}	3×10^3	15,25	3.580.160	223.760.000
1×10^{-3}	3×10^4	17,11	1.063.050	66.440.625
1×10^{-4}	3×10^5	20,20	141.344	8.834.000
1×10^{-5}	3×10^6	23,69	14.467	904.187
1×10^{-6}	3×10^7	28,23	745	46.568
1×10^{-7}	3×10^8	31,00	74	4.625

FONTE: o autor (2011).

Legenda: PFU=Placas formadoras de lise; CT=ciclo “threshold”

Diluições seriadas dez vezes do sobrenadante de cultura do EV, analisadas por RT-PCR convencional, mostraram sinais no gel de agarose compatíveis com os tamanhos dos produtos entre 306 a 316 pb, até a diluição 10^{-7} (figura 14). A diluição 10^{-7} por PCR em tempo real indica que foram detectados 74 cópias de cDNA de EV por reacção.

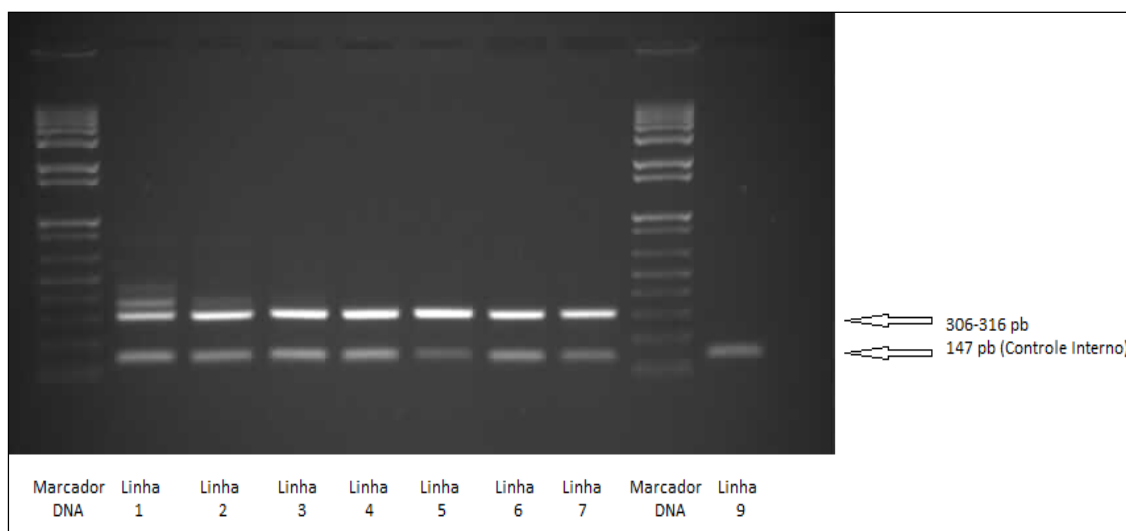


FIGURA 14 – GEL DE AGAROSE 1% CORADO COM BROMETO DE ETÍDEO DEMONSTRANDO OS SINAIS DOS SOBRENADANTES DE CULTURA DILUÍDOS NO LOG_{10} .

LEGENDA: marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen®); linha 1 = 10^{-1} ; linha 2 = 10^{-2} ; linha 3 = 10^{-3} ; linha 4 = 10^{-4} ; linha 5 = 10^{-5} ; linha 6 = 10^{-6} ; linha 7 = 10^{-7} ; marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen®); linha 9 = 10^{-8} .

FONTE: o autor (2011).

4.7 TIPAGEM DOS ENTEROVÍRUS E PARECHOVÍRUS POR SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

A tipagem dos EV/HPeV por sequenciamento nucleotídico foi realizada em 12 amostras de LCR para o gene VP1. As sequências obtidas foram editadas, alinhadas pelo programa BioEdit, analisadas pelo programa Mega 5.0 e agrupadas em 3 ramos e dois gêneros: HEVB e HPeV. A árvore filogenética (figura 15) demonstra as similaridades das sequências obtidas com outras sequências referências depositadas no banco de genes.

4.7.1 Classificação Molecular dos Enterovírus

Das 12 amostras do estudo, 7 foram tipadas como gênero EV, cinco foram como echovirus tipo 30 e duas echovirus tipo 4. Analisou-se as similaridades das amostras do estudo e as sequências referências depositadas no banco de genes, relacionadas no item 3.3.2, p. 72. As sequências analisadas apresentaram uma cobertura de 100%, com similaridades que variam de 94 – 96%. Não se observou

diferenças estatísticas quanto à idade, características de celularidade e bioquímica entre as amostras.

a) Classificação molecular dos echovirus 30

Observa-se na figura 16 que as amostras tipadas como echovirus 30, isolados no ano de 2006, do estudo se agrupam em ramos diferentes dos isolados do Brasil dos períodos de 2005 a 2006. As amostras do estudo apresentaram maiores similaridades com os isolados do Japão, França e Finlândia. O quadro 11 apresenta as divergências entre as amostras, relacionadas na árvore. O dendograma (figura 17) relaciona diferentes amostras e apresenta uma maior similaridade das amostras do estudo com as amostras de echovirus 30 do grupo 4a. A figura 18 apresenta uma similaridade de 96% entre as amostras do estudo e a amostra referência echovirus 30 do grupo 4 a.



FIGURA 15 – DENDOGRAMA DAS AMOSTRAS DE LCR DO ESTUDO E REFERÊNCIAS UTILIZANDO-SE O MÉTODO DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.

Fonte: o autor (2011).

NOTA: a história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Verossimilhança, baseado no modelo de Tamura-Nei (1993). A árvore com o maior log de probabilidade (-1284.8341) está evidenciada. A porcentagem está associada à taxa dos agrupamentos junto aos ramos. A árvore inicial foi obtida como segue. Quando o número de sítios comuns fosse < 100 ou menor que um quarto do número total de sítios, o método da máxima parcimônia foi utilizado; caso contrário o método BIONJ com distância da matrix MCL foi utilizado. A árvore foi desenhada para escala, com comprimento dos ramos medido no número de substituições por sítio. A análise envolveu 50 sequências nucleotídicas. As posições dos códons foram 1° + 2° + 3° + “noncoding”. Todas as posições contendo lacunas ou dados perdidos foram eliminadas. Continha um total de 95 posições no final da análise. A análise evolucionária foi conduzida no programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2007)..

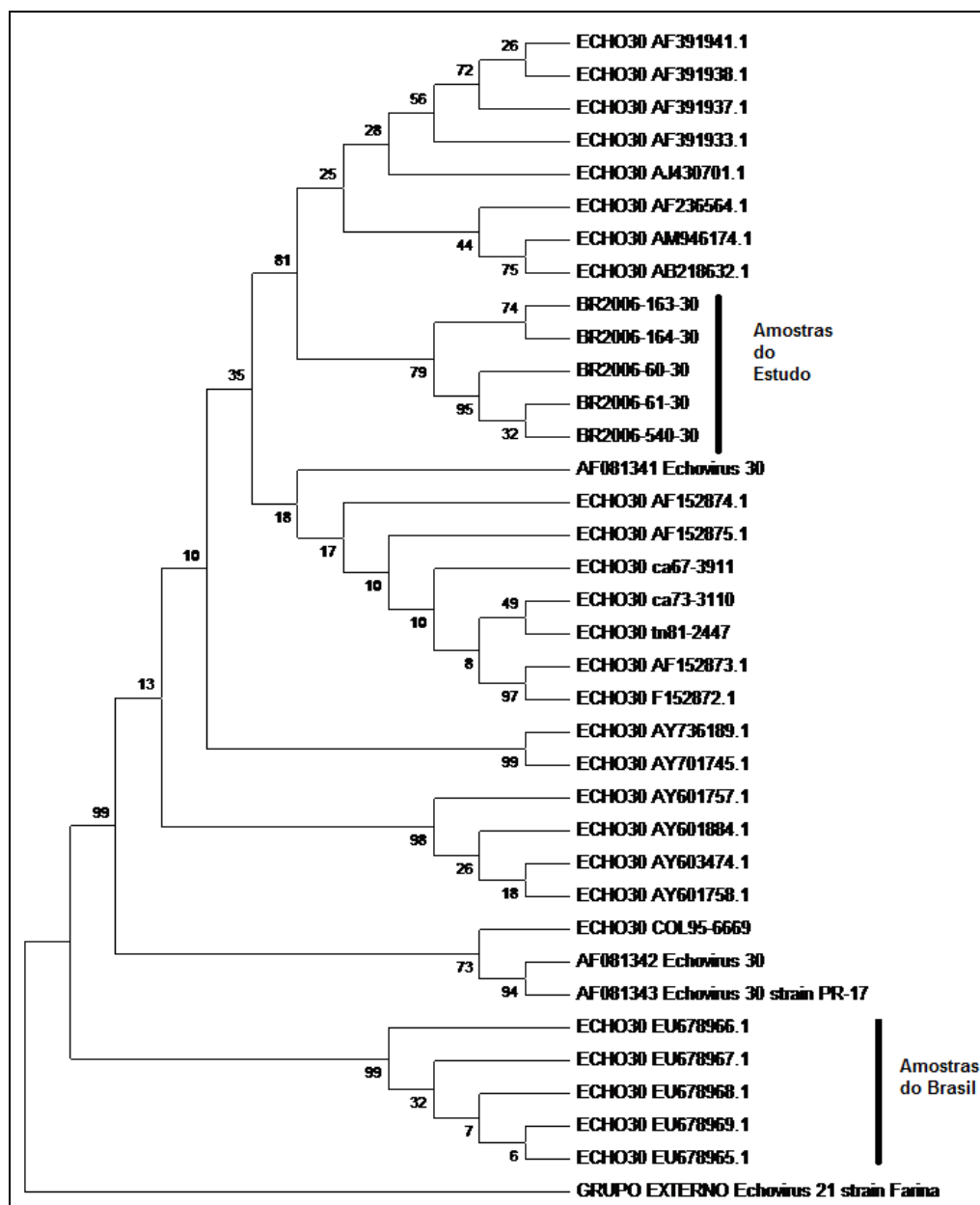


FIGURA 16 – DENDOGRAMA BASEADO NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA PROTEÍNA VP1 EVIDENCIANDO AS AFINIDADES GENÉTICAS DO ECHOVIRUS 30 DAS AMOSTRAS DO ESTUDO COM SEQUÊNCIAS DE OUTROS PAÍSES.

Fonte: o autor (2011).

NOTA: a história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Parsimônia. Árvore # 1 de 45 árvores mais parcimoniosas (comprimento = 295) está indicada. O índice de consistência (0.726592), o índice de retenção (0.912365) e o índice composto é 0.686593 (0.662917) para todos os sítios e os sítios de parcimônia informativas (entre parênteses). A porcentagem de replicatas das árvores em que a taxa foi associada estão agrupadas no teste de bootstrap (500 repetições) são indicados para os ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore de MP foi obtida utilizando o algoritmo de Close-Neighbor-Interchange (NEI; KUMAR, 2000), com um nível de pesquisa 1, no qual as árvores iniciais foram obtidas com a adição aleatória de sequências (10 repetições). Códon foram incluídos 1º 2º 3º + não codificante. Todas as posições que contêm lacunas e dados perdidos foram eliminadas. Houve um total de 37 posições no conjunto final. As análises evolutivas foram conduzidas no programa MEGA5.

QUADRO 11 – ESTIMATIVA DA DIVERGÊNCIA DA EVOLUÇÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE ECHOVIRUS TIPO 30.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
BR2006-163																														
BR2006-61	0																													
BR2006-540	0	0																												
BR2006-164	0	0	0																											
AF391941.1	0	0	0	0																										
AF391938.1	0	0	0	0	0																									
AF391937.1	0	0	0	0	0	0																								
AF236564.1	0	0	0	0	0	0	0																							
AM946174.1	0	0	0	0	0	0	0	0																						
EU678969.1	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8																					
EU678968.1	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	0																				
EU678967.1	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	0	0																			
AY736189.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	1,7	1,7																		
AY701745.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	1,7	1,7	0																	
AY601758.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,4	1,4	1,4	0	0																
AY601884.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,4	1,4	1,4	0	0	0															
AY601757.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,4	1,4	1,4	0	0	0	0														
AY603474.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,4	1,4	1,4	0	0	0	0	0													
AJ430701.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	1,8	1,8	0	0	0	0	0	0												
AF391933.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	1,9	1,9	0	0	0	0	0	0	0											
AB218632.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	1,8	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0										
EU678968.1	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	0	0	0	1,8	1,7	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,8	1,9	1,8								
EU678965.1	1,9	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	0	0	0	1,8	1,7	1,4	1,4	1,4	1,4	1,4	1,8	1,9	1,8	0							
COL95-6669	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	1,7	1,7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,7	1,7							
ca73-3110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,0	2,0	2,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,0	2,0	0						
ca67-3911	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	1,9	1,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	1,9	0	0					
AF152875.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	1,9	1,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	1,9	0	0	0				
AF152874.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	1,9	1,9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,9	1,9	0	0	0	0			
AF152873.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	1,8	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	1,8	0	0	0	0	0	0	
AF152872.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	1,8	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	1,8	0	0	0	0	0	0	0
tn81-2447	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	1,8	1,8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	1,8	0	0	0	0	0	0	0

FONTE: o autor (2011).

NOTA: o número de substituição de aminoácidos por sítio e entre as sequências estão demonstrados. As análises foram conduzidas usando-se o modelo da correção de Poisson (ZUCHERKANDL *et al.*, 1965). A análise envolveu 31 sequências de aminoácidos. A codificação das amostras foi traduzida, assumindo a tabela do código genético padrão. Todas as posições contendo *gaps* ou dados perdidos foram eliminadas. Analisou-se um total de 54 posições. A análise evolucionária foi conduzida no programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2007).

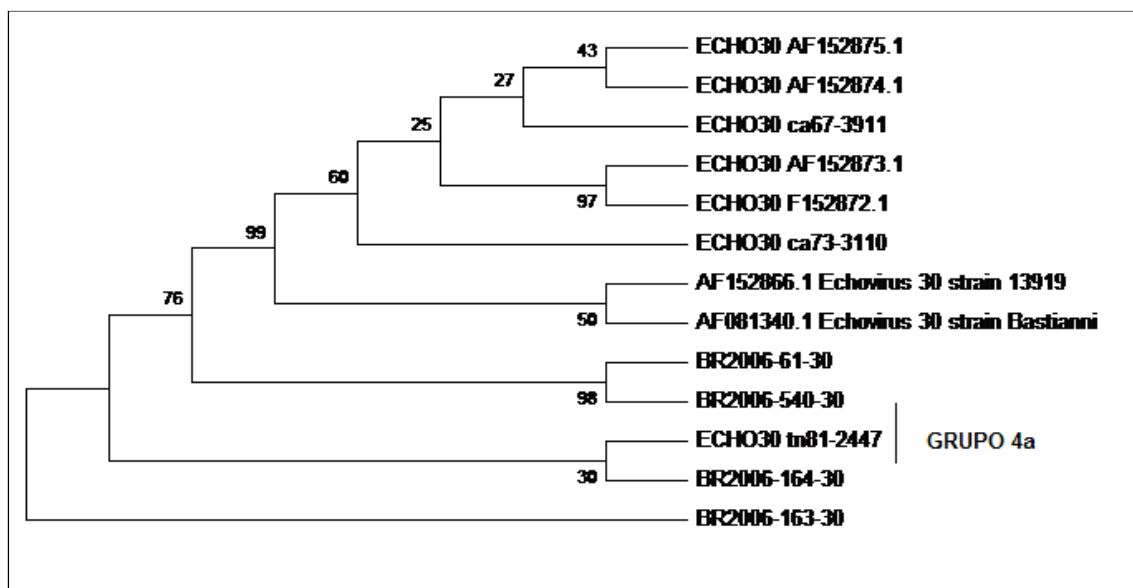


FIGURA 17 – DENDOGRAMA BASEADO NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA PROTEÍNA VP1 EVIDENCIANDO AS AFINIDADES GENÉTICAS DOS SUBGRUPOS DE ECHOVIRUS 30.

FONTE: o autor (2011).

NOTA: a história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Parsimônia. Árvore # 1 de 3 árvores mais parcimoniosas (comprimento = 141) esta indicada. O índice de consistência (0.677419), o índice de retenção (0.801325) e o índice composto é 0.630830 (0.542833) para todos os sítios e os sítios de parcimônia informativas (entre parênteses). A porcentagem de replicatas das árvores em que a taxa foi associada estão agrupadas no teste de bootstrap (500 repetições) são indicados para os ramos (FELSENSTEIN, 1985). A árvore de MP foi obtida utilizando o algoritmo de Close-Neighbor-Interchange (NEI; KUMAR, 2000), com um nível de pesquisa 1, no qual as árvores iniciais foram obtidas com a adição aleatória de sequências (10 repetições). A análise envolveu 13 sequências nucleotídicas. As posições dos códons incluiu 1º 2º 3º + não codificante. Todas as posições que contêm lacunas e dados perdidos foram eliminadas. Houve um total de 37 posições no conjunto final. As análises evolutivas foram conduzidas no programa MEGA5.

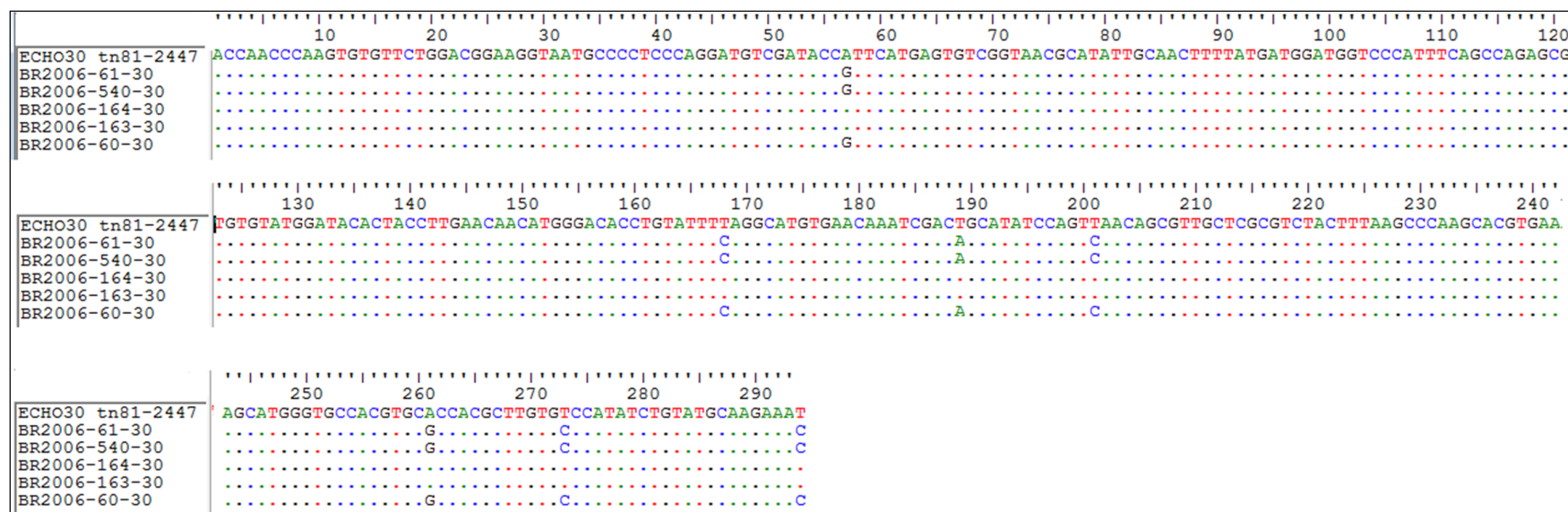


FIGURA 18 – SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS ECHO30 DO ESTUDO EM RELAÇÃO À SEQUÊNCIA DE REFERÊNCIA DO GRUPO 4a.

FONTE: o autor (2011).

NOTA: ECHO30 tn81-2447 – amostra referência grupo 4a; BR2006-61-30, BR2006-540-30, BR2006-164-30, BR2006-163-30 – amostras do estudo.

b) Classificação molecular do echovirus 4

Duas amostras positivas para echovirus 4 foram detectadas no estudo. As duas sequências analisadas por alinhamento apresentaram similaridade de 100% (figura 19). A análise filogenética, por meio do modelo da Máxima Verossimilhança, agrupou as sequências em um ramo, apresentando uma maior homologia das sequências com os isolados dos EUA, Finlândia e Japão.

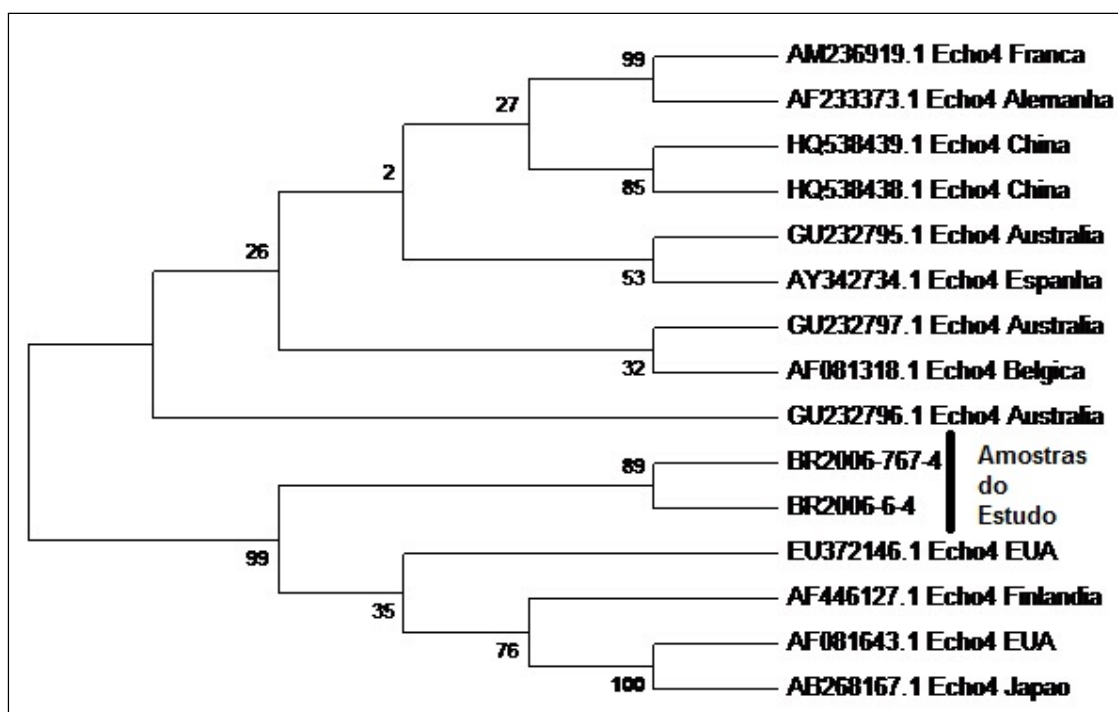


FIGURA 19 – DENDOGRAMA BASEADO NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA PROTEÍNA VP1 EVIDENCIANDO AS AFINIDADES GENÉTICAS DOS ECHOVIRUS 4.

Fonte: o autor

NOTA: a história evolutiva foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança, baseado no modelo de Tamura-Nei. A árvore com o maior log de probabilidade (-712.3091) está evidenciada. A porcentagem está associada à taxa dos agrupamentos junto aos ramos. A árvore inicial foi obtida como segue. Quando o número de sítios comuns fosse < 100 ou menor que um quarto do número total de sítios, o método da máxima parcimônia foi utilizado; caso contrário o método BIONJ com distância da matrix MCL foi utilizado. A árvore foi desenhada para escala, com comprimento dos ramos medido no número de substituições por sítio. A análise envolveu sete sequências nucleotídicas. As posições dos códons foram 1° + 2° + 3° + “noncoding”. Todas as posições contendo lacunas ou dados perdidos foram eliminadas. Continha um total de 132 posições no final da análise. Análise evolucionária foi conduzida no programa MEGA5.

4.7.3 Classificação molecular do parechovírus

As sequências obtidas para o HPeV foram analisadas e comparadas com nove sequências do banco de genes (figura 20). Observou-se que as amostras do estudo se agruparam em um ramo próximo ao EF155422.1, isolado da Holanda. O quadro 14 apresenta as divergências entre as amostras-referência da árvore, reafirmando que as amostras do estudo apresentam grande similaridade com o isolado holandês e grande divergência com as amostras do Brasil (quadro 12).

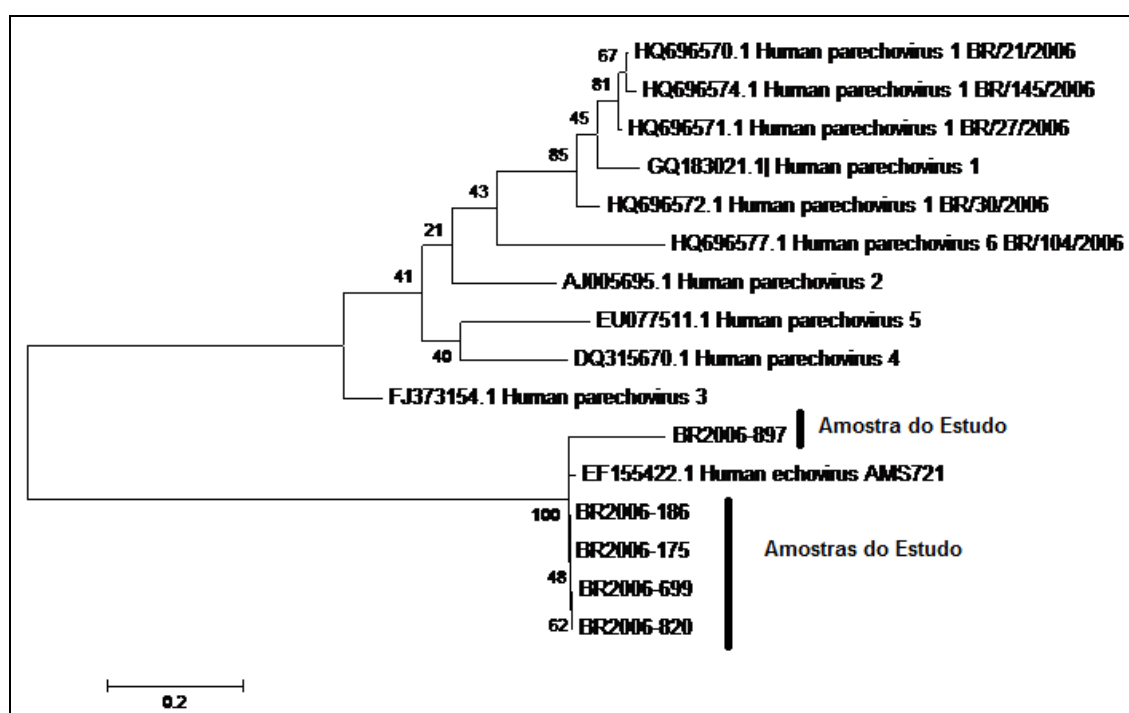


FIGURA 20 – DENDOGRAMA BASEADO NO ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DA PROTEÍNA VP1 EVIDENCIANDO AS AFINIDADES GENÉTICAS DOS DO HPeV POR MEIO DO MÉTODO DA MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA.

Fonte: o autor

NOTA: a história evolutiva foi inferida usando o método de Máxima Verossimilhança, baseado no modelo de Tamura-Nei. A árvore com o maior log de probabilidade (-2167.8435) está evidenciada. A porcentagem está associada à taxa dos agrupamentos junto aos ramos. A árvore inicial foi obtida como segue. Quando o número de sítios comuns fosse < 100 ou menor que um quarto do número total de sítios, o método da máxima parcimônia foi utilizado; caso contrário o método BIONJ com distância da matrix MCL foi utilizado. A árvore foi desenhada para escala, com comprimento dos ramos medido no número de substituições por sítio. A análise envolveu 50 sequências nucleotídicas. As posições dos códons foram 1° + 2° + 3° + “noncoding”. Todas as posições contendo lacunas ou dados perdidos foram eliminadas. Continha um total de 270 posições no final da análise. A análise evolucionária foi conduzida no programa MEGA5.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
BR2006-175																
BR2006-18	0															
BR2006-699	0	0														
BR2006-820	0	0	0													
BR2006-897	0	0	0	0												
EF155422.1	0	0	0	0	0											
EU077511.1	2	2	2	2	2	2										
GQ183021.1	2	2	2	2	3	2	0									
FJ373154.1	2	2	2	2	3	2	0	0								
HQ696570.1	2	2	2	2	2	2	0	0	0							
HQ696577.1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0						
HQ696574.1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0					
HQ696572.1	2	2	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0				
HQ696571.1	2	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0			
AJ005695.1	3	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0		
DQ315670.1	2	2	2	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

QUADRO 12 – DIVERGÊNCIA EVOLUCIONÁRIA ESTIMADA ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE HPeV.
 FONTE: o autor (2011).

NOTA: o número de substituição de aminoácidos por sítio entre as sequências está evidenciado. As análises foram conduzidas utilizando-se o modelo de Poisson. A análise envolveu 16 sequências de aminoácidos. O código foi transcrito assumindo o código genético padrão. Todas as posições que continham lacunas ou dados perdidos foram eliminadas. Há 75 posições no final da amostragem. A análise evolucionária foi conduzida no programa MEGA5.

Os pacientes com amostras positivas para HPeV apresentaram idades que variaram de 7 a 12 anos. A maioria das amostras foi coletada no mês de março, com predominância dos sintomas de febre, vômito e cefaleia, 60% dos pacientes tiveram rigidez de nuca e 20% apresentaram sinais de Kernig-Brudzinski. A mediana de idade foi 8 anos ($p=0,03$), ácido láctico 2,4 mmol/L ($p=0,03$), log10 de carga viral 4,8 (tabela 4). Para echovirus 30 e echovirus 04 não se observou diferenças estatísticas significantes.

TABELA 4 - COMPARAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS
EPIDEMIOLÓGICAS E CARACTERÍSTICAS DE LCR DOS EV E HPEV

	EV Mediana	HPEV Mediana	p
N	07	05	
Gênero M	2	2	
F	5	3	
Idade anos	6	8	0,03
Sazonalidade	Verão	Verão	
Leucócitos/mm ³	194	122	0,79
Linfócitos %	98	99	1
Glicose mg/dL	67	61	1
Proteína mg/dL	53	49	0,57
Ácido Láctico	1,8	2,4	0,03
Carga Viral	6.551	155.500	0,07
Log ₁₀	3,8	5,2	0,07

Mann-Whitney; p<0,05

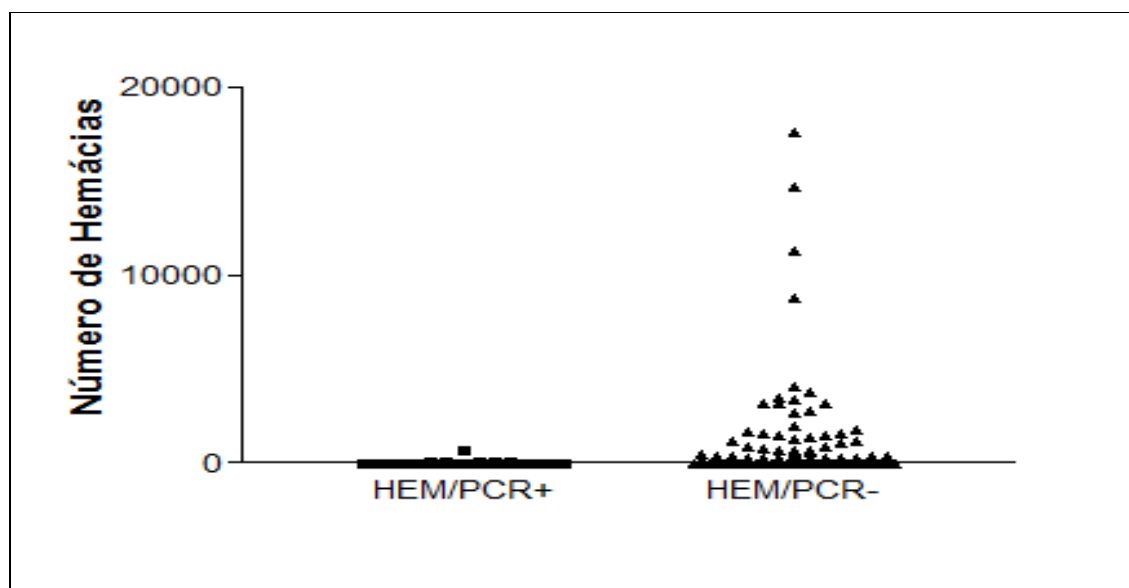
4.8 RESULTADOS DE PCR ASSOCIADOS AOS FATORES INIBITÓRIOS

EV não foram detectados em 89% das amostras por RT-PCR obtidas de pacientes com suspeita clínica de meningite viral. Observou-se nas análises por RT-PCR que as amostras negativas apresentaram um número de hemácias significativamente elevado ($p = 0,0027$) (tabela 2, p.76) em relação às amostras positivas (figura 21). A mesma análise considerando as amostras incluídas no ensaio de PCR em tempo real não apresentou a mesma significância estatística ($p=0,1385$) (figura 22).

Para as amostras com resultados negativos por RT-PCR o tempo de coleta após o aparecimento dos sintomas variou de 0 – 14 dias, mediana de 7 dias, IQ (25-75%) 3,5-11,5. As amostras positivas apresentaram mediana de 3 dias IQ (25-75%) 0,5-4,5. Na figura 23, está demonstrada a coleta de 399 amostras de LCR em relação ao tempo, em dias, das amostras com resultados positivos e negativos por RT-PCR, após o início dos sintomas. Observa-se que há uma maior concentração

de amostras negativas nos primeiros dias de coleta após o início dos sintomas e nos três dias subsequentes uma maior concentração de amostras positivas ($p=0,0389$).

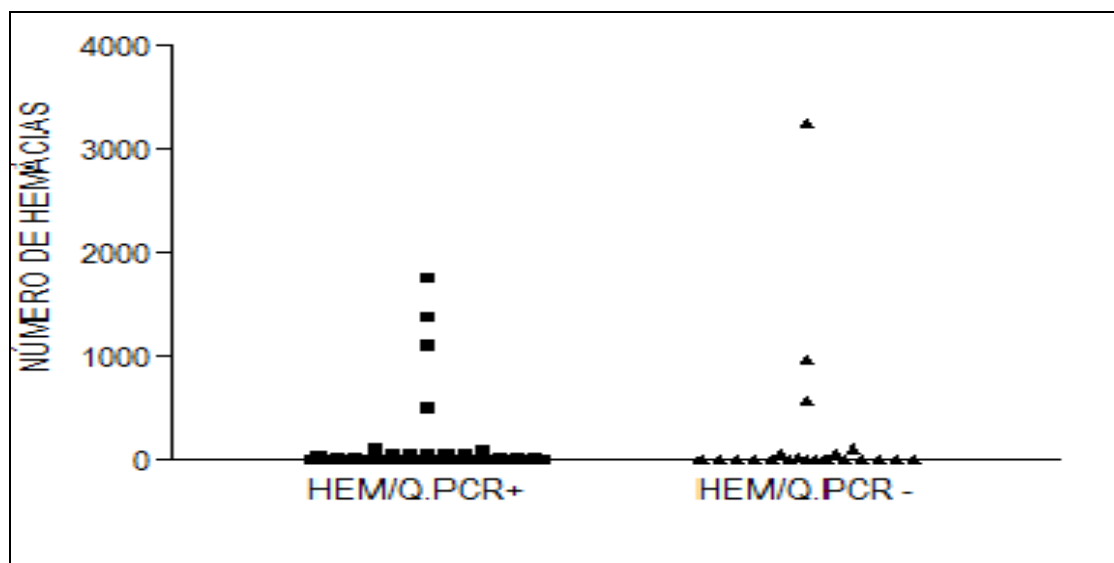
Para as amostras com resultados negativos por PCR em tempo real o tempo de coleta após o aparecimento dos sintomas variou de 0 – 7 dias, mediana de 3,5 dias, IQ (25-75%) 3,5-7. As amostras positivas apresentaram mediana de 2,5 dias IQ (25-75%) 0,5-4,5. A figura 24 representa a coleta das amostras de LCR positivas e negativas em relação ao tempo, em dias, por PCR em tempo real, após o início dos sintomas. Observa-se que não há diferença significativa entre a distribuição das amostras em relação ao tempo de coleta após o início dos sintomas ($p=0,4958$).



Mann-Whitney $p=0,0027$

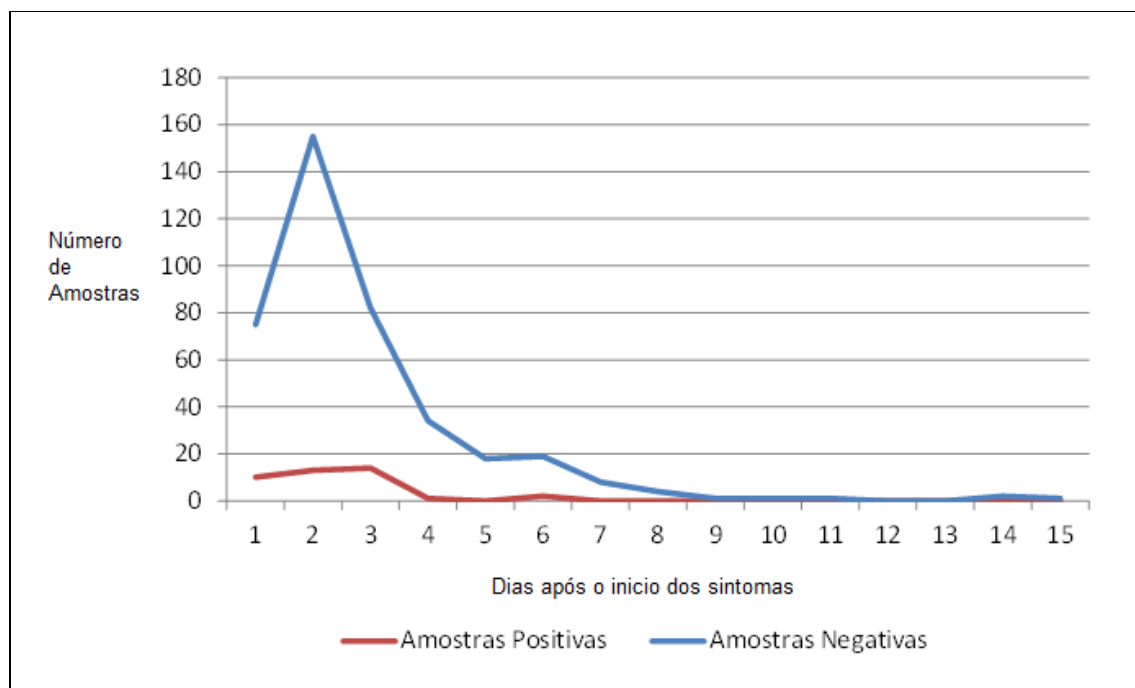
FIGURA 21 – GRÁFICO DO NÚMERO DE HEMÁCIAS E RESULTADOS DE RT-PCR.

FONTE: o autor (2011)



Mann-Whitney $p=0,1385$

FIGURA 22 – GRÁFICO DO NÚMERO DE HEMÁCIAS E RESULTADOS DE PCR EM TEMPO REAL.
FONTE: o autor (2011)



Mann-Whitney $p=0,0389$

FIGURA 23 – GRÁFICO DO NÚMERO DE AMOSTRAS DE LCR RT-PCR NEGATIVAS E POSITIVAS DE ACORDO COM O TEMPO DE COLETA (EM DIAS) APÓS O INÍCIO DOS SINTOMAS.

FONTE: o autor (2011).

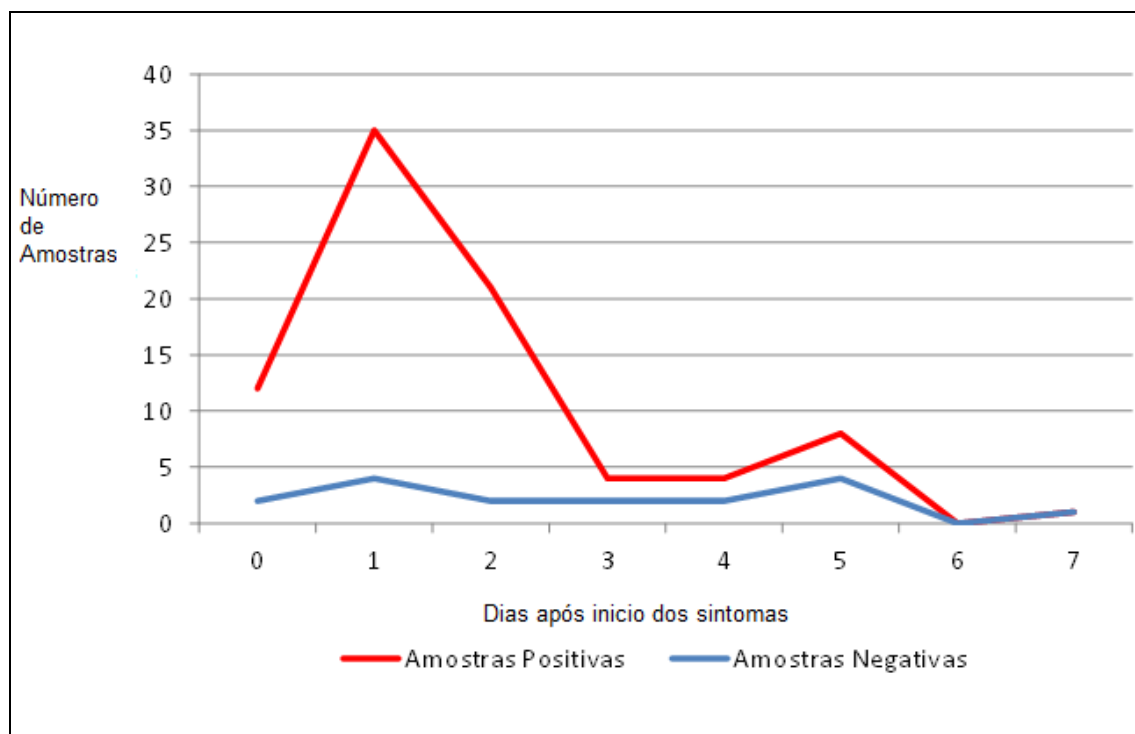
Mann-Whitney $p=0,4908$

FIGURA 24 – GRÁFICO DO NÚMERO DE AMOSTRAS DE LCR POR PCR EM TEMPO REAL NEGATIVAS E POSITIVAS DE ACORDO COM O TEMPO DE COLETA (EM DIAS) APÓS O INÍCIO DOS SINTOMAS.

Fonte: o autor

4.9 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS CASOS DE MENINGITES NOTIFICADOS NO ANO DE 2006 EM CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA

A figura 25 demonstra a distribuição dos casos coletados e positivos no ano de 2006, que foram analisados e distribuídos no mapa de bairros. Observa-se uma concentração de casos nas regiões centrais do mapa. O bairro CIC (Cidade Industrial de Curitiba) apresentou um maior número de casos coletados. Na Região Metropolitana, as cidades de Agudos do Sul, Piraquara e Colombo demonstraram um maior número de coletas. Na figura 25, pode-se verificar a ocorrência de duas amostras positivas na mesma região geográfica, no bairro do Xaxim.

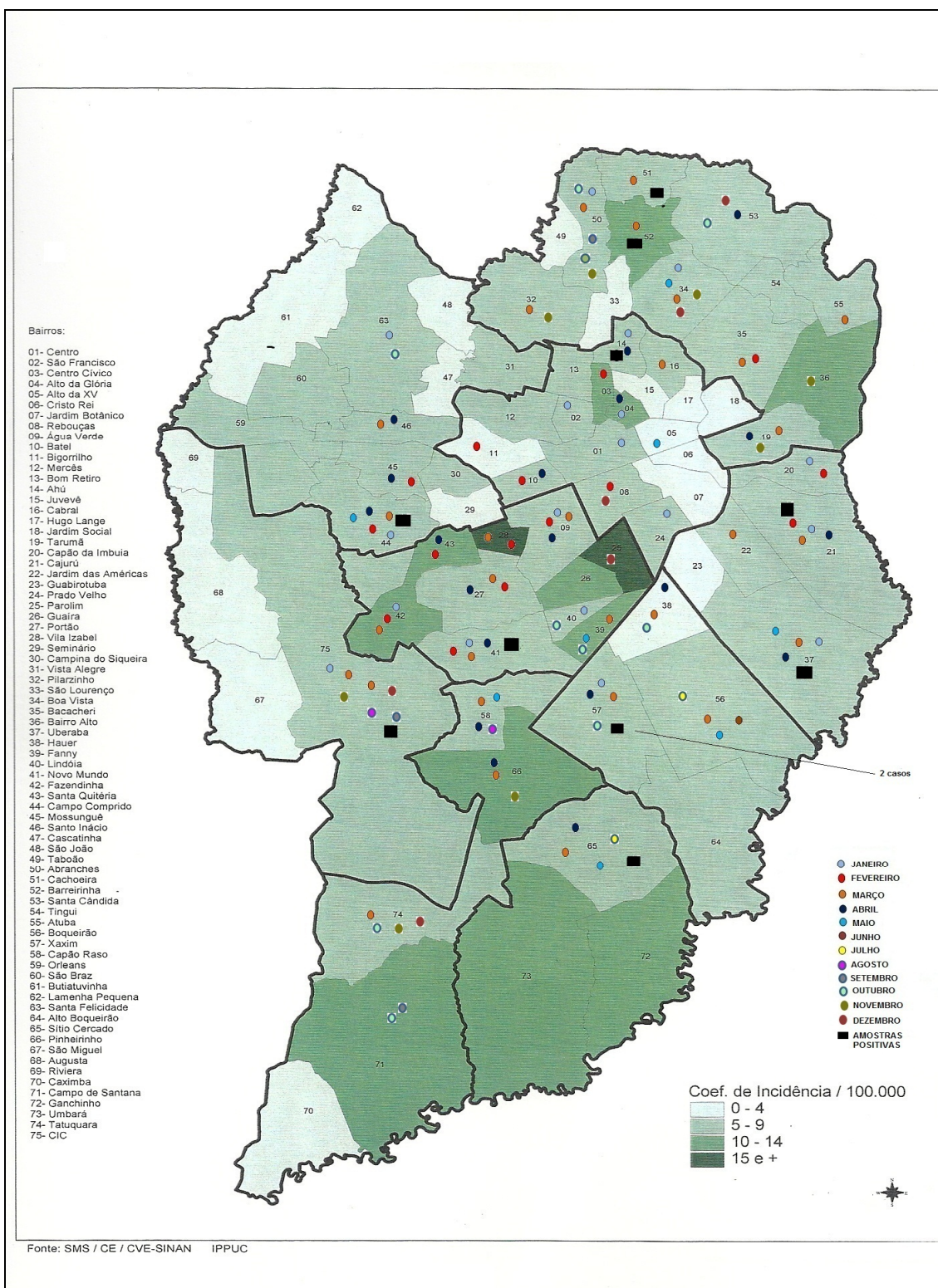


FIGURA 25 – COEFICIENTE DE INCIDÊNCIA DAS MENINGITES VIRAIS POR BAIRRO EM CURITIBA E REPRESENTAÇÃO ESPACIAL DOS CASOS COLETADOS E POSITIVOS PARA EV E HPEV NO ANO DE 2006.

Legenda: números 1-75 = Bairros de Curitiba;

Fonte: adaptado de Bonato e Yano/ Geoprocessamento Marcelo Ventorello

5 DISCUSSÃO

As infecções virais do SNC não são incomuns nas rotinas dos atendimentos de saúde, no entanto, pouco se sabe sobre a incidência desses casos. Os pacientes usualmente apresentam sinais clínicos de meningite ou encefalite que variam na sua gravidade. Vários agentes etiológicos podem estar relacionados às doenças do SNC, bactérias, fungos, protozoários, sendo os agentes virais os mais comuns. O grande desafio para o clínico é a distinção entre as várias apresentações das meningites, sendo o diagnóstico rápido e acurado decisivo para o manejo clínico do paciente. Porém, na maioria das vezes, os sintomas são muito similares e pacientes que apresentam pleiocitose no LCR são rotineiramente hospitalizados e tratados com antibióticos, embora poucos tenham meningites por bactérias. Segundo Brivet e colaboradores, a avaliação do LCR é um determinante crítico e frequentemente decisivo nas meningites bacterianas. No entanto, em 30 – 40% dos casos a coloração de Gram é negativa e os outros parâmetros do LCR não auxiliam no diagnóstico devido à sobreposição dos resultados, não sendo possível a diferenciação entre a meningite bacteriana e viral (BRIVET *et al.*, 2005). Adicionalmente, nos estágios iniciais de uma meningite viral, os achados podem mimetizar uma doença bacteriana e a mudança dos achados de células, polimorfonucleares no LCR para mononucleares, pode acontecer somente depois de 24 horas após o aparecimento dos sintomas. Vários estudos têm como objetivo a validação de um modelo multivariável para diferenciação das meningites por vírus ou bactérias no momento da apresentação do paciente (NIGROVIC; KUPPERMANN; MALEY, 2002; BONSU *et al.*, 2008; BRIVET *et al.*, 2005; AGÜERO *et al.*, 2010). Nesse contexto, a análise crítica do LCR é uma parte essencial do diagnóstico de um paciente com sinais e sintomas de doença do SNC (CINQUE *et al.*, 2003).

No Brasil, os dados são limitados, especialmente dados referentes às infecções virais do SNC na cidade de Curitiba e Região Metropolitana. O presente estudo tem como objetivo identificar a circulação dos EV em pacientes com sinais e sintomas de meningites virais, por meio de metodologias de biologia molecular, compilar dados da análise do LCR, bem como apresentar dados demográficos e epidemiológicos referentes aos pacientes incluídos no estudo. Os resultados desse estudo podem contribuir para um melhor entendimento da epidemiologia dessas viroses na nossa região.

5.1 CARACTERÍSTICAS CELULARES E BIOQUÍMICAS DO LCR

Os sinais e sintomas clássicos de meningites como febre, dor de cabeça, fotofobia, náusea, vômitos e dor na nuca não discriminam as meningites virais das bacterianas. Assim, as características celulares e bioquímicas do LCR, bem interpretadas, são parâmetros complementares para o diagnóstico de doenças do SNC. A avaliação do LCR depende de quais testes devem ser solicitados, os valores normais, adequados às idades dos pacientes e às limitações dos testes. A concentração de proteínas, pressão e razão de glicose no LCR e soro variam com a idade.

As características celulares do LCR normal incluem contagem de leucócitos até 5 células/mm³ em adultos e 20 células/mm³ em neonatos. A citologia diferencial do LCR normal em adultos compreende 60 + 20% de linfócitos, 30 + 15% de monócitos e 2% de neutrófilos. Em neonatos os valores são 20 + 15% de linfócitos, 70 + 20% de monócitos e 4% de neutrófilos (SEEHUSEN; REEVES; FOMIN, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2007). Os parâmetros de celularidade foram utilizados como critérios de inclusão das amostras no estudo, considerou-se o número de leucócitos ≥ 4 células/mm³, com predomínio de linfócitos, padrão esperado nas meningites virais. Pode ocorrer, em menor proporção, indivíduos com sintomas de meningite por etiologia viral, no início da infecção um predomínio de neutrófilos (BRIVET *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2007), porém, estes pacientes foram excluídos do estudo. A coleta do LCR nos pacientes do estudo foi realizada por punção lombar. Em 344 (78%) pacientes a coleta do LCR foi realizada até o terceiro dia após o início dos sintomas. As contagens diferenciais de células entre os pacientes positivos e negativos para EV/HPeV não apresentaram diferenças estatísticas significantes, exceto o número de hemácias, com medianas de 5 células/mm³ e 1,3 células/mm³ para os pacientes com resultados de RT-PCR negativos e positivos, respectivamente ($p = 0,0027$).

As quantificações de glicose e proteína foram normais, sem diferenças estatísticas significantes entre os pacientes EV/HPeV positivos e negativos. O limite normal de glicose é dado de acordo com o valor de glicose no soro, sendo no LCR 2/3 desse no soro. Usualmente, nas meningites virais os níveis de glicose são normais e nas meningites bacterianas, em que geralmente os níveis de glicose são

mais baixos, 50% dos pacientes podem apresentar valores de glicose normais (SEEHUSEN; REEVES; FOMIN, 2003).

Há amplas evidências na literatura indicando que, em uma variedade de tecidos, que incluem o cérebro, a ativação de Na^+/K^+ - ATPase estimulam a glicólise, ou seja, absorção de glicose e produção de ácido láctico. Nesse contexto, vários estudos têm demonstrado a grande utilidade da quantificação do lactato como diagnóstico diferencial das meningites (ALMEIDA *et al.*, 2009). A utilização da quantificação do lactato no LCR para diferenciar as meningites tem sido amplamente reportada, vários estudos indicam que o lactato é um melhor preditor que a quantificação da glicose, além disso, a metodologia utilizada é automatizada, de execução relativamente fácil e apresenta boas sensibilidade e especificidade (ZIMMERLI, 2005; CUNHA, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2009). Para as amostras do estudo, considerou-se o valor do lactato no LCR em um limite de 3,5 mmol, sendo que a maioria dos pacientes apresentou mediana de 2,1 mmol.

5.2 OCORRÊNCIA DE CASOS POSITIVOS EM RELAÇÃO À TEMPERATURA MÉDIA MENSAL E ÍNDICE PLUVIOMÉTRICO

As meningites virais têm sido relatadas como importantes causas de morbidade, com uma incidência estimada em 5 – 15 casos por 100.000 habitantes por ano, no Reino Unido, e aproximadamente 75.000 casos a cada ano nos EUA (RAMERS *et al.*, 2000; CHADWICK, 2006). A maioria dos vírus causadores das meningites apresenta a característica marcante de sazonalidade. Os EV ocorrem nos meses de maiores temperaturas: verão e primavera (BÖTTNER *et al.*, 2002). Este estudo demonstrou que o maior número de amostras positivas ocorreu nos meses de maiores temperaturas, dezembro, janeiro e fevereiro, meses que também apresentaram alto índice pluviométrico. No entanto, alguns autores considerem que no Hemisfério Sul, devido às condições climáticas, os EV poderiam circular na mesma proporção durante o ano todo (BUESCHER; ARTENSTEIN; OLSON, 1968; MEYER JUNIOR *et al.*, 1960). Observou-se que a circulação dos EV foi similar ao descrito no Hemisfério Norte. Nos climas temperados, os EV ocorrem durante as estações de verão e primavera, porém, observa-se uma incidência durante o ano todo em áreas tropicais ou subtropicais. Nesse estudo observamos que os EV

apresentaram uma taxa de prevalência importante e são os principais agentes etiológicos envolvidos nas meningites virais. Esses dados corroboram com dados de diferentes relatos de outras regiões geográficas (BERLIN *et al.*, 1993; ARCHIMBAUD *et al.*, 2009). Acredita-se que a transmissão fecal-oral desses agentes é facilitada particularmente entre crianças, cujos hábitos de higiene são limitados, especialmente nas temperaturas mais elevadas. Adicionalmente, relacionado à transmissão direta, pessoa a pessoa, há relatos da recuperação dos EV em moscas, água parada e lixo (KLOWDENM & GREENBERG, 1974). Observou-se a circulação dos EV/HPeV com dois picos em 2006. Esse padrão bifásico pode ser atribuído à circulação de diferentes sorotipos no mesmo ano. As infecções por EV tendem a se disseminar entre famílias e pequenas comunidades ou áreas geográficas limitadas. No estudo, observamos a distribuição dos casos em áreas geográficas próximas com até dois casos positivos na mesma área, porém os dados são insuficientes para determinar a ocorrência de surto.

5.3 ANÁLISE DAS AMOSTRAS POR RT-PCR

A coleta das amostras de LCR foi realizada em três hospitais de referência na cidade de Curitiba, no período de 2005 a 2006. Todos os casos incluídos no estudo foram de pacientes com sinais e sintomas clínicos de meningites, além de características laboratoriais de LCR sugestivas de meningite viral. Adicionalmente, todos os cuidados descritos em material e métodos de acondicionamento, transporte, armazenamento e processamento das amostras para preservação do material genético, prevenção de contaminação e monitoramento de todos os processos foram adotados. Num total de 440 amostras de LCR incluídas no presente estudo, 49 (11%) apresentaram genomas de EV por RT-PCR. Os dados de prevalência encontrados estão em concordância com diferentes autores que referem a importância de se estabelecer um protocolo diagnóstico para auxiliar no manejo clínico do paciente, bem como levantamento de dados epidemiológicos para monitorar o reaparecimento de novas cepas de EV (COLIMON, 2002; SHOJA *et al.*, 2007).

Santos *et al.* (2006) descreveram a frequência das meningites por EV em amostras de LCR de 11 estados do Brasil. Os EV foram detectados em 15,8% das

amostras, com uma predominância do echovirus tipo 30, identificando cinco surtos de meningite no período de 1998 a 2003. Os autores ressaltam a importância da determinação dos padrões epidemiológicos responsáveis pela frequência das meningites virais e as relações filogenéticas das cepas nas diferentes regiões do Brasil. Mendonza *et al.* (2006), no Brasil, também descreveram o envolvimento viral nas infecções do SNC. Os autores analisaram 200 amostras de LCR utilizando a metodologia de PCR, e genomas virais foram detectados em 23,34% das amostras, que incluíram: CMV (6%), HSV1 (5%), VZV e EBV (0,5%) e EV (11,34%). Outro estudo, realizado no Norte do Brasil, relatou uma prevalência de 13,2% de amostras positivas para EV utilizando-se metodologias de cultura celular, imunofluorescência e teste de neutralização. Os autores relatam a importância de determinar a situação nacional das meningites virais no Brasil, já que esses dados ainda estão indefinidos (LAMARÃO *et al.*, 2005). Relato do sul do Brasil, no Estado do Paraná, indica a incidência de agentes virais em pacientes com suspeita clínica de meningites virais, sendo os EV responsáveis por 83% dos casos e os herpesvírus por 17% (VIDAL *et al.*, 2011). Apesar da utilização de diferentes metodologias, a proporção de amostras positivas foi similar às encontradas no presente estudo. Além disso, a taxa de incidência dos EV apresenta variações e, provavelmente, está relacionada às diferentes populações incluídas nos estudos, bem como a utilização de diferentes iniciadores na RT-PCR. Adicionalmente, os EV podem ser detectados por diferentes metodologias, RT-PCR, PCR em tempo real ou isolamento em cultura celular. As incidências reportadas variam de 10 a 46%, sendo os EV os agentes etiológicos comumente descritos nas meningites linfocitárias. Observa-se, ainda, coinfeção pelos vírus da família herpes e EV, principalmente EBV e HHV6, que são detectados em menores proporções (MICHOS *et al.*, 2007; BRUNEL *et al.*, 2008; TAKAVOLI *et al.*, 2008). No presente estudo observou-se uma paciente com 3 meses de idade coinfectada por EV e EBV.

Muitos autores reportam a dificuldade de distinguir uma meningite asséptica de uma meningite bacteriana devido à sobreposição de sinais e sintomas, especialmente em crianças (BRUNEL *et al.*, 2008; MICHOS *et al.*, 2007, ALMEIDA *et al.*, 2009). Nesse contexto, a análise detalhada do LCR é fundamental para o diagnóstico de pacientes com suspeita de infecção viral do SNC, e a metodologia de PCR tem comprovado sua grande importância no diagnóstico dessas infecções (CINQUE *et al.*, 2003).

Análises por biologia molecular oferecem grandes vantagens em relação à cultura celular, a qual requer trabalho árduo para obtenção de crescimento celular e vários dias para identificação do agente etiológico (RAMERS *et al.*, 2000). O uso da PCR baseado na pesquisa específica da sequência do gene 5'-NCR, região altamente conservada nos diferentes tipos virais, demonstra uma vantagem na detecção do agente em amostras de LCR, já que os resultados podem ser obtidos após poucas horas da coleta da amostra e certamente isso contribuirá no manejo clínico do paciente, resultando no uso racional de antibióticos ou encurtamento do período da hospitalização (DeBIASI; TYLER, 2004).

A análise de amostras de LCR por PCR tem demonstrado grande sensibilidade e especificidade analítica, revolucionando o diagnóstico virológico (CHESKY *et al.*, 2000; MINJOLLE *et al.*, 2002; CINQUE *et al.*, 2003; DeBIASI; TYLER, 2004). Antes da preconização da PCR o diagnóstico virológico de infecções do SNC era realizado utilizando-se metodologias de cultura celular ou demonstração da resposta de anticorpos intratecais, assim, em muitos casos o diagnóstico era retrospectivo (DAVIES *et al.*, 2005). Além disso, a PCR apresenta grandes vantagens, pois possibilita recuperar, amplificar e detectar baixas cópias de genoma viral. A metodologia de RT-PCR utilizada no estudo demonstrou por meio do ensaio de infectividade uma boa sensibilidade analítica de 74 cópias de cDNA/reação, uma alta especificidade (94%), com uma baixa sensibilidade diagnóstica (16%). Para a RT-PCR a extração do material genético, foi realizada utilizando-se o tampão contendo isotiocinanto de guanidina, sendo que a mistura dos reagentes foi realizada no laboratório de virologia. Este tampão apresentou uma recuperação do material genético de 69%, além disso, a purificação do material genético não foi eficiente, pois, fatores inibitórios como; a presença de hemácias no LCR parecem ter inibido a reação de PCR. Adicionalmente, a RT-PCR detectou amostras com quantidades de carga viral menores quando comparadas com a PCR em tempo real. Apesar dos fatores limitantes, no estudo, a extração do RNA do EV/HPeV e síntese do cDNA foi realizada em um prazo máximo de seis horas, com uma ótima taxa de especificidade, com o objetivo de preservar e recuperar o genoma viral, além de auxiliar prontamente no manejo clínico do paciente.

5.4 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE LCR POR PCR EM TEMPO REAL

Para o laboratório clínico de virologia, a utilização da metodologia de PCR em tempo real trouxe muitas vantagens: a rapidez e definição do diagnóstico das infecções do SNC, características importantes para o adequado manejo clínico do paciente, propiciando a utilização racional da antibioticoterapia e abreviando a ansiedade de um diagnóstico de meningite bacteriana. A sensibilidade analítica da PCR em tempo real para detec

ção dos EV para o diagnóstico das meningites virais foi de 91%, ótima sensibilidade se comparada com outros relatos; 77,8; 85%; 72,6%, respectivamente que utilizaram o cultivo celular como método de comparação (TANEL *et al.*, 1996; GORGIEVSKIH-RISOHO *et al.*, 1998; VERSTREPEN *et al.*, 2002). Vários estudos utilizaram vários formatos de metodologias por biologia molecular, as quais apresentaram ótimas taxas de sensibilidade e especificidade (CASAS *et al.*, 1997; KILPATRICK *et al.*, 1998; POZO *et al.*, 1998; SINDIC *et al.*, 2003; BORISKIN *et al.*, 2003; McIVER *et al.*, 2005). Porém, altas taxas de sensibilidade podem estar associadas a resultados falsos-positivos (HOSOYA, *et al.*, 1998). Por esse motivo, utilizou-se no estudo precauções extremas para prevenção de contaminações que poderiam levar a resultados falsos-positivos, tais como salas separadas para: sala 1, preparo da mistura de reação; sala 2, extração da amostra; sala 3, amplificação além da adição de controles internos, controles negativos e positivos a fim de monitorar a extração, amplificação e contaminações. Por meio da metodologia de PCR em tempo real observou-se uma positividade de 46% para as amostras selecionadas. Comparando-se os resultados de RT-PCR e PCR em tempo real, foram observadas boas sensibilidade e especificidade, porém, uma concordância moderada com a RT-PCR (índice Kappa de 0,417). Essa concordância moderada entre as metodologias podem ser devidas a alguns fatores: (1) o procedimento de extração entre os testes, já que, para a metodologia de PCR em tempo real, a extração foi realizada com kit comercial padronizado e com uma eficiência de extração de aproximadamente 100%. Em contrapartida, as amostras para RT-PCR foram extraídas utilizando-se o tampão de extração com tiocianato de guanidina, sendo esse produzido no laboratório; (2) os diferentes grupos avaliados apresentaram diferenças nas cargas virais, o que sugere que a carga viral poderia estar abaixo do limite de detecção do teste de RT-PCR. As amostras que foram positivas por RT-PCR apresentaram carga

viral substancialmente maior na metodologia de PCR em tempo real; (3) iniciadores ou sondas divergentes para um sorotipo de EV podem ter interferido na detecção; (4) presença de inibidores.

Selecionou-se para essa avaliação pacientes doentes de acordo com as escalas propostas por Nigrovic (2002) e Brivet *et al.* (2004), com algumas modificações. Os pacientes que apresentaram pontuação igual a zero foram denominados doentes, dois grupos controles foram considerados: grupo controle normal, pacientes sem alterações liquóricas, número de células ≤ 4 , proteína e glicose normais; grupo de pacientes com PCR no líquido positivo para outros vírus. O grupo de doentes apresentou uma positividade de 55% em relação ao número total de amostras, apresentando as características operacionais de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos aceitáveis, além de apresentar um índice de Youden, que indica um critério de escolha de um teste diagnóstico. Valores próximos de um são os aceitáveis, porém, uma avaliação criteriosa deverá levar em conta o objetivo da utilização do teste. Observou-se no grupo controle normal uma amostra amplificada tanto por RT-PCR quanto PCR em tempo real e apresentou uma baixa carga viral. Está relatado na literatura que as enteroviroses podem ocasionalmente serem detectadas em amostras de LCR que não apresentam pleocitose (WILDIN & CHONMAITREE, 1987; SAWYER *et al.*, 1994; HOSOYA *et al.*, 1998). Duas amostras, RT-PCR EV negativas, do grupo controle, composto por amostras com PCR positivos para outros vírus foram amplificadas por PCR em tempo real para EV, ambas, apresentaram cargas virais baixas e, possivelmente, não foram amplificadas na RT-PCR devido à baixa sensibilidade desta metodologia. Utilizando-se a metodologia de PCR em tempo real o tempo para obtenção dos resultados foi de aproximadamente 3 horas. Além disso, a metodologia permite a detecção e quantificação da carga viral, é menos laboriosa e o desenvolvimento da técnica é realizado em um sistema fechado minimizando contaminações e dispensando a utilização do brometo de etidium, agente altamente nocivo a saúde do manipulador.

5.5 TIPAGEM DOS ENTEROVÍRUS E PARECHOVIUS HUMANOS POR SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

A tipagem dos EV é importante, primeiramente, por fornecer informações sobre as similaridades genéticas entre os vírus, na investigação epidemiológica e da imunidade viral. Além disso, permite identificar cepas mutantes e mais virulentas e sua relação com doenças específicas, (MUIR *et al.*, 1998).

Até pouco tempo, o diagnóstico das infecções por EV eram baseadas no isolamento em cultura celular, seguido da tipagem por meio do ensaio de neutralização ou pela demonstração da resposta imunológica do hospedeiro. São técnicas trabalhosas que requerem mais de 60 cepas virais e não são viáveis para um diagnóstico de rotina, sendo utilizadas ocasionalmente em estudos epidemiológicos. Além disso, devido a mutações, recombinações ou presença de diferentes vírus na mesma amostra, o ensaio de neutralização não é adequado (HYYPÍÁ *et al.*, 1997). Atualmente, o sequenciamento nucleotídico e a análise filogenética estão sendo extensivamente aplicados em estudos epidemiológicos e para diagnóstico, especialmente para os poliovírus, protótipos do gênero EV (KEW *et al.*, 1995). Muitos estudos têm aplicado a mesma estratégia os EV não poliovírus. Os primeiros estudos baseavam-se no sequenciamento do segmento 5' terminal codificadora VP2, porém, devido ao baixo valor de “*bootstrap*” entre os grupos e pobre discriminação entre os sorotipos, a região 5' terminal de VP2 não é adequada para análises de filogenia ou tipagem molecular (OBERSTE *et al.*, 1998). Outros estudos descrevem o sequenciamento genético baseado na região VP1, pois importantes sítios de neutralização estão situados nessa região e se relacionam com os sorotipos. Oligonucleotídeos iniciadores degenerados que contêm deoxyinosina reconhecem especificamente regiões internas ou próximas do gene VP1 dos EV (OBERSTE *et al.*, 1999a; OBERSTE *et al.*, 1999b). Das 12 amostras sequenciadas no estudo, utilizando como alvo a região VP1, identificou-se os EV tipos echovirus 30 e echovirus 4, além do gênero parechovírus humano.

A frequência anual de isolamento de echovirus 30 nos EUA e Canadá variaram amplamente nos últimos 38 anos, com muitos picos que correspondem às epidemias de meningite asséptica, o mesmo padrão pode ser encontrado em outras regiões como: Victoria e Austrália. Os dados de vigilância epidemiológica indicam que o E30 segue um modo epidêmico de transmissão, causando surtos e tornando-

se silencioso por períodos de anos, de modo endêmico. O modo silencioso provavelmente deve-se à imunidade adquirida durante surtos epidêmicos na população. O vírus é responsável por casos esporádicos até o desenvolvimento de uma população não imune, causando novos surtos. A circulação do vírus ocorre em períodos, que estão associados a diferentes e novas linhagens genômicas. Nos EUA, foram descritos quatro grupos geneticamente distintos de E30 (OBERSTE *et al.*, 1999c). No estudo, detectou-se E30 geneticamente similar ao grupo 4a. Nos EUA, o grupo 2 foi substituído pelo grupo 4 no ano de 1981, próximo a uma epidemia.

Em um estudo de vigilância do CDC, no período de 1970-2005, o ECHO 30 foi o terceiro agente mais comum isolado (KETSURIANI *et al.*, 2006). Outros autores relatam o envolvimento do E30 em grande proporção de surtos em várias regiões do mundo (TRALLERO *et al.*, 2000; TRALLERO *et al.*, 2003; FAUSTINI *et al.*, 2006; BAILLY *et al.*, 2008; LIN *et al.*, 2008; BINGJUN *et al.*, 2008; BRUNEL *et al.*, 2008). Infecções por E30 são erradicadas em poucos dias e, por analogia com os poliovírus, as partículas virais e células infectadas pelo vírus são provavelmente neutralizadas pós resposta humoral (PALLANSCH; ROOS, 2007). Muitos relatos de surtos por ECHO 30 são descritos, mas não está definido se o grande número de observações são resultados de mudanças na prática médica, devido aos avanços do diagnóstico por biologia molecular ou mudanças epidemiológicas, como a frequência da transmissão interindivíduos (BAILLY *et al.*, 2008). Silva *et al.* (2006) descreveram que o E30 foi o agente viral mais frequente em amostras de LCR provenientes de dois surtos e em casos esporádicos de meningites po EV no Brasil. Em regiões do Pará, Rio de Janeiro e São Paulo há relatos do envolvimento do E30 em surtos (GOMES *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2009; PINTO JUNIOR *et al.*, 2009).

Outro tipo viral encontrado em menor proporção, no estudo, foi o echovirus 4, o qual tem sido relatado como agente responsável por surtos de meningites em vários países. O vírus tem um padrão cíclico irregular de circulação, com uma prevalência de aproximadamente 4,6% (KHETSURIANI *et al.*, 2006). Os pacientes apresentaram um perfil de celularidade com média de 8 leucócitos/mm³, com predominância de 99% de linfócitos

Os vírus HPeV eram classificados como echovirus 22 e echovirus 23, atualmente, foram reclassificados por análise filogenética em HPeV-1 e HPeV-2,

respectivamente. Outros genótipos foram descritos como HPeV 3, 4, 5 e 6. As manifestações clínicas da infecção pelo vírus incluem a meningite asséptica, encefalomielite, paralisia plácida aguda e sepse neonatal com enterocolite necrosante (ITO, *et al.*, 2004; KHETSURIANI *et al.*, 2006; VRIES, *et al.*, 2008). Os HPeV têm sido reportados como agentes das meningites em uma proporção de 1 – 3%, em pacientes com idade menor que 2 anos, e pode ser causa de doença grave em crianças com meses de idade. O HPeV tipo 3 é o comumente isolado em amostras de LCR (PIÑEIRO *et al.*, 2010). No estudo, cinco (42%) amostras apresentaram uma similaridade de 100% com a cepa da Holanda (AMS721). A maioria das amostras foi de pacientes com idades de 7-12 anos, superiores aos relatos atuais, os quais descrevem a circulação do vírus em crianças menores de 2 anos (WOLTHERS *et al.*, 2008; HARVALA *et al.*, 2009; PIÑEIRO *et al.* 2010), e o tipo mais frequente das infecções do SNC relatado é o HPeV3 (BOIVIN *et al.*, 2005; BENSCHOP *et al.*, 2006; VAN DER SANDEN *et al.*, 2008; HARVALA *et al.*, 2009). A maioria dos novos genótipos foi, recentemente, caracterizada por grupos de pesquisa em diferentes regiões e grupos de pacientes, sendo necessários outros estudos para a caracterização epidemiológica do vírus. Estabeleceu-se que as infecções por HPeV são comuns em crianças e as síndromes relacionadas ao SNC afetam crianças de idades menores de 3 anos, notavelmente, poucos estudos reportam infecções por HPeV em indivíduos acima de 12 anos (HARVALA *et al.* 2009). O presente estudo relata o envolvimento do HPeV essencialmente em indivíduos de 7 – 14 anos, sendo o primeiro relato no Estado do Paraná da ocorrência do HPeV e na faixa etária em indivíduos acima de 7 anos.

5.6 RESULTADOS DE PCR ASSOCIADOS AOS FATORES INIBITÓRIOS

O grande número de amostras com resultados negativos para os vírus estudados sugere outras causas de meningites linfocitárias que podem estar associadas a outros agentes infecciosos, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Cryptococcus neoformans*, *Listeria monocytogenes*, *Brucella spp.*, *Mycoplasma*, neurocisticercose, leptospirose ou condições não infecciosas, que incluem doenças autoimunes e meningites carcinomatosas (ALMEIDA *et al.*, 2007). Outros vírus não testados incluem o adenovírus, HIV, rubéola e sarampo.

Adicionalmente, está bem estabelecida a implicação de fatores inibitórios nos resultados da PCR (DAVIES *et al.*, 2006). Além disso, está descrito que em amostras coletadas antes de três dias do início dos sinais e sintomas neurológicos somente 12% apresentaram resultados positivos. Um maior número de amostras recoletadas após três dias apresentaram resultados positivos, observando um incremento de positividade no quarto ou quinto dia (DAVIES *et al.*, 2006). Nesse estudo, a maioria das amostras foi coletada no primeiro dia (média de 12 horas), após o início dos sintomas, o que pode explicar o grande número de amostras negativas pela técnica de PCR. O achado de um número maior de amostras positivas entre as coletadas após o segundo dia depois do início dos sintomas confirmam estes dados e sugerem que a coleta de amostras de LCR poderia aumentar a detecção dos EV ou HPeV. Além disso, foram observadas amostras com um elevado número de hemácias no LCR ($p = 0,0071$) e, provavelmente, a presença de hemoglobina, especificamente o anel de porfirina na molécula da hemoglobina, foi um fator inibitório na PCR, ocasionando resultados falsos-negativos. Com a utilização de reagentes comerciais de extração obteve-se uma amostra mais purificada e provavelmente uma melhor recuperação do material genético.

O material utilizado nos procedimentos foram livres de DNA/RNAses para minimizar os fatores de inibição, os quais são limitantes para as análises por biologia molecular. Além disso, todos os procedimentos foram realizados em três salas separadas: sala 1 para o preparo da mistura de tampões, oligonucleotídeos iniciadores; sala 2 para a extração e adição do DNA na mistura de reação; sala 3 para a amplificação e detecção dos produtos e todos os passos da reação foram monitorados por controles internos de reação, controles positivos e negativos. Realizou-se o desenvolvimento das metodologias em cabine de segurança biológica e micropipetas, devidamente monitorados por manutenções preventivas e corretivas, com o objetivo de minimizar as intercorrências e resultados falsos-positivos ou negativos.

5.7 DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DOS CASOS DE MENINGITES NOTIFICADOS NO ANO DE 2006 EM CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA

O monitoramento da circulação dos EV para determinar os padrões da infecção, dados epidemiológicos, moleculares e laboratoriais são importantes para definir estratégias de saúde pública e do manejo clínico. A análise espacial da distribuição de amostras coletadas e positivas do estudo demonstraram que bairros mais pobres da região de Curitiba apresentaram um índice maior de amostras coletadas e positivas. Além disso, observou-se uma circulação do vírus nos meses de temperaturas elevadas indicando padrão sazonal dos vírus, muito bem caracterizado em países com clima temperado (PALLANSCH & ROOS, 2007; KHETSURIANI *et al.*, 2006). Em países com clima tropical, descreve-se que a circulação dos enterovírus ocorre durante o ano todo, porém, não foi o que se observou.

A distinção entre as meningites virais e bacterianas não é fácil na rotina dos serviços de saúde devido à interposição de sinais clínicos e achados laboratoriais. Certamente, um diagnóstico de alta sensibilidade e precoce auxiliaria no manejo clínico do paciente, controlando o uso inadequado da antibioticoterapia, abreviaria tempo de hospitalização. Ainda contribuiria para a economia nos procedimentos diretos e indiretos de saúde e propiciando dados epidemiológicos fidedignos, demonstrando o cenário real das síndromes do SNC em nossa região. A identificação temporal dos EV demonstrando os aspectos da circulação dos diferentes sorotipos, o monitoramento de surtos por novos sorotipos e a recombinação entre os picornavírus seria possível com a adoção de protocolos diagnósticos precoces e de alta sensibilidade, além disso, diminuiria o impacto que um diagnóstico de meningite, sem um agente estabelecido, causa na sociedade. Até bem pouco tempo, o diagnóstico das meningites virais era realizado por isolamento em cultivo celular, metodologia que exige uma estrutura física e equipamentos adequados e específicos. Além de ser extremamente trabalhosa, requerendo grande habilidade técnica, os resultados não auxiliam o diagnóstico, pois a detecção do efeito citopático em células susceptíveis é demorado. Na maioria das vezes, o diagnóstico das meningites virais baseia-se unicamente nos critérios clínicos e métodos convencionais de laboratório, tais como, o cultivo celular, soroneutralização. Alguns estudos desenvolveram algoritmos clínicos laboratoriais

para ajudar na exclusão de meningite bacteriana (SPANOS *et al.*, 2003; NIGROVIC; KUPPERMANN; MALLEY, 2002; BRIVET *et al.*, 2005; AGÜERO *et al.*, 2010). Muitas vezes, os achados laboratoriais, como contagem de células e diferenciação de células não são específicos. Desde a padronização dos métodos moleculares, observou-se grande progresso no diagnóstico das síndromes do SNC. A utilização das metodologias de PCR pode definir um diagnóstico precocemente, podendo reduzir significativamente o tempo de hospitalização, uso indevido de antibióticos e, custos diretos e indiretos com procedimentos de saúde (MICHOS *et al.*, 2007). Frequentemente, os custos para o desenvolvimento das técnicas de PCR em tempo real são significativamente maiores que os custos de métodos tradicionais como o cultivo celular. No entanto, custos com reagentes e equipamentos podem ser minimizados, com a utilização de metodologia de altas sensibilidade e especificidade, técnica menos trabalhosa e obtenção de resultados em menor tempo. Para as diferentes metodologias de PCR em tempo real já se observa um ganho de tempo para a obtenção dos resultados e quando comparados com o método tradicional de cultivo celular este tempo se reduz em 25 vezes. Adicionalmente, o desenvolvimento da metodologia é realizado em um sistema fechado, o que minimiza as contaminações tanto das amostras quanto protege o técnico das manipulações com brometo de etídio altamente nocivas a saúde, além de prevenir a produção de lixo tóxico (ESPY; UHL; SLOAN, 2006).

Doem *et al.*, 1994, relatam que a obtenção dos resultados, no mesmo dia do atendimento, para identificação bacteriana e testes de susceptibilidade antimicrobiana resultaram redução de custos por paciente foi de U\$ 4.000, relativos a hospitalização e testes adicionais de laboratório e estes foram estatisticamente significantes. Os dados representaram uma economia de custos para a instituição de \$ 2.402.162 (DOEN *et al.*, 1994). Estudos similares são importantes para verificar se a utilização da técnica de PCR em tempo real poderão resultaram em redução de custos.

No presente estudo, foram selecionadas amostras de LCR de pacientes com sinais e sintomas de meningite viral. Analisou-se as características de celularidade e bioquímicas do LCR e demonstrou-se que a utilização de métodos de biologia molecular podem definir o agente etiológico em aproximadamente oito horas. Com a estratégia de sequenciamento foi possível detectar o vírus parechovírus humano, sendo esse o primeiro relato em Curitiba e no Estado do Paraná.

6 CONCLUSÕES

No estudo analisou-se 440 amostras de LCR coletadas de pacientes com suspeita clínica de meningite viral, nos hospitais de referência da cidade de Curitiba Estado do Paraná, Hospital pequeno Príncipe, Hospital Universitário Evangélico de Curitiba e Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná no período de 2005 a 2006. Utilizando-se as metodologias de biologia molecular foi possível concluir:

- A metodologia de RT-PCR demonstrou uma sensibilidade diagnóstica menor que o PCR em tempo real, porém, uma especificidade maior, com valores preditivos positivos semelhantes. As cargas virais, por PCR em tempo real, das amostras positivas por RT-PCR, foram significativamente maiores. O índice Kappa resultou em uma concordância moderada entre os testes. A metodologia de PCR em tempo real demonstrou uma melhor associação com a doença.
- Por meio do ensaio de infectividade as metodologias demonstraram a mesma sensibilidade analítica.
- Os tipos de EV encontrados foram o echovirus 30 (subgrupo 4a) e 4 e HPeV. As amostras positivas para HPeV demonstram diferenças significantes nos parâmetros de idade, ácido láctico, carga viral no LCR.
- O EV e HPeV foram observados em todas as idades abaixo de 30 anos, com predomínio de amostras positivas nos intervalos de idades de 7 a 17 anos. Houve um predomínio de pacientes do sexo masculino sem significância estatística.
- Ocorreu uma predominância de hemácias nas amostras negativas por RT-PCR, além disso, o tempo de coleta das amostras após o início dos sintomas foram menores em relação às amostras positivas. Estes fatores podem ter limitado a detecção dos genomas EV por RT-PCR.
- Infecção do SNC por EV ou HPeV foi observada durante os meses de verão. A metodologia de PCR é efetiva e rápida para definir o agente etiológico das infecções do SNC.

REFERÊNCIAS

- ABED, Y.; BOIVIN, G. Human parechovirus infections in Canada. **Emerging of Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, p. 969-975, 2006.
- ABERLE, S. W.; PUCHHAMMER-STÖCKL. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 25, p. S79-S85, 2002.
- ADEB, Y. *et al.* Development of a serological assay based on a synthetic peptide selected from the VP0 capsid protein for detection of human parechoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 45, p. 2037-2039, 2007.
- AGÜERO, G. *et al.* Validación de una regla de predicción clínica para diferenciar meningitis bacteriana de meningitis aséptica. **Archivos Argentinos Pediatricos**, Buenos Aires, v. 108, p. 40- 44, 2010.
- AL-SUNAI, M. *et al.* Analysis of a new human parechovirus allows the definition of parechovirus types and the identification of RNA structural domains. **Journal of Virology**, Washington, v. 81, p. 1013-1021, 2007.
- ALLANDER, T. *et al.* A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v. 98, p. 11609-11614, 2001.
- ALMEIDA, S. M. O sistema nervoso central é um sítio imunologicamente privilegiado? **Revista Brasileira de Neurologia**, São Paulo, v. 35, p. 81-86, 1999.
- ALMEIDA, S. M. *et al.* Laboratorial diagnosis of lymphocytic meningitis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 11, n. 5, p. 478-484, 2007.
- ALMEIDA, S. M. *et al.* Quantitation of cerebrospinal fluid lactic acid in infectious and non-infectious neurological diseases. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 47, p. 755-761, 2009.
- ARAÚJO, A. Q. C. **Aspectos clínicos das encefalites e meningites virais**. Disponível em: <<http://www.medstudents.com.br/index.htm>>. Acesso em: 8 set. 2007.
- ARCHIMBAUD, C. *et al.* Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children and adults with aseptic meningitis. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 81, p. 42-8, 2009.
- BAILLY, J. L. *et al.* Génotypage et épidémiologie moléculaire des entérovirus non poliomyéelitiques. **Virologie**, Paris, v. 1, p. 53-65, 2008.
- BENSCHOP, K. S. M. *et al.* Fourth human parechovirus serotype. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, p. 1572-1575, 2006.

BERG, B.; GÄRDESELL, P.; SKÅNSBERG, P. Cerebrospinal fluid lactate in the diagnosis of meningitis. Diagnostic value compared to standard biochemical methods. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Stockholm, v. 2, p. 111-115, 1982.

BERLIN, L. *et al.* Aseptic meningitis in infants < 2 years of age: diagnosis and etiology. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 168, p. 888-92, 1993.

BINGJUN, T. *et al.* Molecular typing and epidemiology of non-polio enteroviruses isolated from Yunnan Province the people's Republic of China. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 80, p. 670-679, 2008.

BOIVIN, G.; ABED, Y.; BOUCHER, F. D. Human parechovirus 3 and neonatal infection. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 11, p. 103-105, 2005.

BONATO, L. W.; YANO, L. J. **Análise espacial dos casos de meningite viral em Curitiba no ano de 2006**. 39 f. Monografia (Curso de Saúde Pública) – Escola de Saúde Pública, Secretaria Estadual da Saúde, Curitiba, 2008.

BONSU, B. K. *et al.* A decision rule for predicting bacterial meningitis in children with cerebrospinal fluid pleocytosis when gram stain is negative or unavailable. **Clinical Practice**, San Diego, v. 15, p. 437-444, 2008.

BORISKIN, Y. S. *et al.* DNA microarrays for virus detection in cases of central nervous systems infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 42, p. 5811-5818, 2004.

BÖTTNER, A. *et al.* A season of aseptic meningitis in Germany: epidemiologic, clinical and diagnostic aspects. **The Pediatric Infectious Diseases Journal**, Dallas, v. 21, p. 1126-1132, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS – DATASUS. Informações de Saúde. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br>>. Acesso em: 1 fev. 2007.

BRIVET, F. G. *et al.* Accuracy of clinical presentation for differentiating bacterial from viral meningitis in adults: a multivariate approach. **Intensive Care Medicine**, Roma, v. 31, p. 1654-1660, 2005.

BROWN, B. *et al.* Complete genomic sequence shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. **Journal of Virology**, Washington, v. 77, n. 16, p. 8973-8984, 2003.

BRUNEL, D. *et al.* Clinical and virological features of an aseptic meningitis outbreak in North-Eastern France. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam. v. 42, p. 225-228, 2008.

BUESCHER, E. L.; ARTENSTEIN, M. S.; OLSON, L. C. Central nervous system infection of viral etiology: the changing pattern. **Association for Research in Nervous and Mental Disease**, Baltimore, v. 44, p. 147-63, 1968.

CALVERT, J. *et al.* Recombination dynamics of human parechoviruses: investigation of type-specific differences in frequency and epidemiological correlates. **Journal of General Virology**, London, v. 91, p. 1229-1238, 2010.

CANN, A. J. *et al.* Reversion to neurovirulence of the live-attenuated Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 7787-92, 1984.

CARSTENS, J. *et al.* Detection of enteroviruses in cell cultures by using in situ transcription. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 25-35, 1992.

CASAS, I. *et al.* New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. **Journal of Virological Methods**, London, v. 53, p. 25-36, 1995a.

CASAS, I *et al.* Two different PCR assays to detect enteroviral RNA in CSF samples from patients with acute aseptic meningitis. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 47, p. 378-385, 1995b.

CASAS, I. *et al.* Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. **Journal of Virological Methods**, London, v. 66, p. 39-50, 1997.

CASAS, I. *et al.* Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for enterovirus and herpesviruses in a prospective study. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 57, p. 145-151, 1999.

CASTRO, C. M. O. *et al.* Echovirus 30 associated with cases of aseptic meningitis in state of Pará, Northern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 444-450, 2009.

CHADWICK, D. R.; LEVER, A. M. L. The impact of new diagnostic methodologies in the management of meningitis in adults at a teaching hospital. **Quarterly Journal of Medicine**, Oxford, v. 95, p. 663-670, 2000.

CHADWICK, D. R. Viral meningitis. **British Medical Bulletin**, Oxford, v. 10, p. 75-76, 2006.

CHAPMAN, N. M. *et al.* Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 28, p. 843-850, 1990.

CHANG, K. H. *et al.* The nucleotide sequence of Coxsackievirus A9; implications for receptor binding and enterovirus classification. **Journal of General Virology**, London, v. 70, p. 3269-3280, 1989.

CHESKY, M. *et al.* Polimerase chain reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, São Paulo, v. 58, n. 3-B, p. 836-842, 2000.

CINQUE, P.; BOSSOLASCO, S.; LUNDKVIST, A. Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 26, p. 1-28, 2003.

COMMITTEE ON ENTEROVIRUSES. The enteroviruses. **American Journal of Public Health**, Washington, v. 47, p. 1556-1566, 1957.

COMMITTEE ON ENTEROVIRUSES. Classification of human enteroviruses. **Virology**, v. 16, p. 501-504, 2000.

COLIMON, R. Introduction to the virological diagnosis of the most frequent infections of the central nervous system. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 25, p. 51-53, 2002.

COYLE, P. K. Overview of acute and chronic meningitis. **Neurologic Clinics**, Philadelphia, v. 17, p. 691-700, 1999.

CUNHA, B. A. Distinguishing bacterial from viral meningitis: the critical importance of the CSF lactic acid levels. **Intensive Care of Medicine**, Roma, v. 32, p. 1272-1273, 2006.

CURITIBA. Secretaria Municipal de Saúde. **Boletim Epidemiológico de Curitiba**, ano XV, n. 1, 2004.

DALLDORF, G.; SICKLES, G. M. The coxsackie viruses. In: LENNETTE, E. H.; SCHMIDT, N. J. **Diagnostic procedures for virus and rickettsial diseases**. 2. ed. New York: American Public Health Association, 1996.

DAVIES, N. W. S. *et al.* Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, Sidney, v. 76, p. 82-87, 2005.

DeBIASI, R. L.; TYLER, K. L. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. **Clinical Microbiology Reviews**, Pennsylvania, v. 17, p. 903-925, 2004.

DESPRÈS, P., FRENKIEL, M. P., DEUBEL, V. Differences between cell membrane fusion activities of two dengue type-1 isolates reflect modifications of viral structure. **Virology**, London, v. 1, p. 209-219, 1993.

DOEN, G. V.; VAUTOUR, r.; GAUDET, M.; LEVY, B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 32, p. 1757-1762, 1994.

DREXLER, J. F. *et al.* Novel human parechovirus from Brazil. **Emerging of Infectious Diseases**, Atlanta, v. 15, p. 310-313, 2009.

ECHEVARRÍA, J. M. *et al.* Laboratory diagnosis of subacute and acute encephalitis probably of viral origin: seven years of experience. **Neurologia**, Madrid, v. 12, p. 381-3, 1997.

ENDERS, J. F.; WELLER, T. H.; ROBBINS, F. C. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissue. **Science**, New York, v. 109, p. 85-87, 1949.

ESPY, M. J., UHL, J. R.; SLOAN, L. M. *et al.* Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. **Clinical Microbiology Reviews**, Pennsylvania, v. 19, p. 165-256, 2006.

FAUSTINI, A. *et al.* An outbreak of aseptic meningitis due to echovirus 30 associated with attending school and swimming in pools. **International Journal of Infectious Diseases**, Ottawa, v. 10, p. 291-297, 2006.

FRANTZIDOU, F. *et al.* Aseptic meningitis and encephalitis because of herpesviruses and enteroviruses in an immunocompetent adult population. **European Journal of Neurology**, Oulu, v. 15, p. 995-997, 2008.

FREIRE, M. C. *et al.* Análisis de um brote de meningitis viral em la província de Tucumán. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Buenos Aires, v. 13, n. 4, p. 246-251, 2003.

GILDEN, D. H. *et al.* Herpesvirus infections of the nervous system. **Nature Clinical Practice Neurology**, London, v. 3, p. 82-94, 2007.

GOMES, M. L. C.; KOPECKA, H.; LINHARES, A. C. Detection of enterovirus in cases of neurological disorders in the state of Pará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 6, p. 321-324, 2001.

GOMES, M. L. C. *et al.* Neutralizing antibodies to enterovirus 71 in Belém, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 47-49, 2002.

GOMES, M. L. C. *et al.* RT-PCR for confirmation of echovirus 30 isolated in Belém, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 4, p. 403-406, 2007.

GORGIEVSKI-HRISOHO, M. *et al.* Detection by PCR of enteroviruses in cerebrospinal fluid during a summer outbreak of aseptic meningitis in Switzerland. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 36, p. 2408-12, 1998.

GUNEY, C. *et al.* Laboratory diagnosis of enteroviral infections of the central nervous system by using nested RT-polymerase chain reaction (PCR) assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, Iowa, v. 47, p. 557-562, 2003.

HALL, T. A. BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 45, p. 95-98, 1999.

HAN, J. *et al.* Echovirus 30 in EV71-associated hand, foot and mouth disease outbreak, Guangxi, China. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 50, p. 348-349, 2011.

HARVALA, H. *et al.* Specific association of human parechoviruses type 3 with sepsis and fever in young infants, as identified by direct typing of cerebrospinal fluid samples. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 199, p. 1753-1760, 2009.

HOSOYA, M. *et al.* Application of PCR for various neurotropic viruses on the diagnosis of viral meningitis. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam. v. 11, p. 117-124, 1998.

HOVI, T. M.; STERVIK M.; ROSENLEW, M. Relative abundance of enterovirus serotypes in sewage differs from that in patients-clinical and epidemiology implications. **Epidemiology and Infection**, London, v. 116, p. 90-97, 1996.

HUBINGER, M. G. Von; LIBERTO, M. I. M. Picornaviridae. In: OLIVEIRA, L. do H. dos S. **Virologia humana**. 1. ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994.

HUGHES, P. J. *et al.* The nucleotide sequence of a type 3 poliovirus isolated during a recent outbreak of poliomyelitis in Finland. **Journal of General Virology**, London, v. 67, p. 2093-102, 1986.

HUGHES, P. J. *et al.* The complete nucleotide sequence of coxsackievirus A21. **Journal of General Virology**, London, v. 70, p. 2943-52, 1989.

HUY, N. T. *et al.* Cerebrospinal fluid lactate concentration to distinguish bacterial from aseptic meningitis: a systemic review and meta-analysis. **Critical Care**, New Jersey, v. 6, p. R240, 2010.

HYYPÄÄ, T. P. *et al.* Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. **Journal of General Virology**, London, v. 78, p. 1-11, 1997.

IIZUKA, N.; KUGE, S.; NOMOTO, A. Complete nucleotide sequence of the genome of coxsackievirus B1. **Virology**, London, v. 156, p. 64-73, 1987.

ITO, M. *et al.* Isolation and identification of a novel human parechovirus. **Journal of General Virology**, London, v. 85, p. 391-398, 2004.

JÄÄSKELÄINEN, A. J. *et al.* Multiplex-PCR and oligonucleotide microarray for detection of eight different herpesviruses from clinical specimens. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam. v. 37, p. 83-90, 2006.

JEFFERY, K. J. M. *et al.* Diagnosis of viral infections of the central nervous system: clinical interpretation of PCR results. **The Lancet**, Oslo, v. 349, p. 3313-317, 1997.

JENKINS, O. *et al.* The complete nucleotide sequence of coxsackievirus B4 and its comparison to other members of the Picornaviridae. **Journal of General Virology**, London, v. 68, p. 1835-48, 1987.

JOHNSON, G. *et al.* Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 38, n. 9, p. 3274-3279, 2000.

JUNIOR V. L. P. *et al.* Description of a Widespread Outbreak of Aseptic Meningitis Due to Echovirus 30 in Rio de Janeiro State, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, n. 13, p. 367-370.

KAPOOR, A. *et al.* A highly prevalent and genetically diversified *Picornaviridae* genus in South Asian Children. **PNAS**, New York, v. 105, p. 20482-20487, 2008.

KEW, O. M. *et al.* Molecular epidemiology of polioviruses. **Seminars in Virology**, v. 6, p. 401-414, 1995.

KHETSURIANI, N. *et al.* Enterovirus surveillance – United States, 1970-2005. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 55, p. 1-21, 2006.

KILPATRICK, D. R. *et al.* Serotype-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 36, p. 352-357, 1998.

KIM, N. T. P. *et al.* Novel human parechovirus, Sri Lanka. **Emerging of Infectious Diseases**, Atlanta, v. 16, p. 130-132, 2010.

KING, A. M. Q. *et al.* *Picornaviridae*. In: Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. New-York, San Diego: Academic Press, 2000. p. 657-673.

KING, R. L. *et al.* Routine cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction testing reduces hospitalization and antibiotic use for infants 90 days of age or younger. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 120, p. 489-496, 2007.

KITAMURA, N. *et al.* Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. **Nature**, Philadelphia, v.291, p. 547-553, 1981

KLOWDENM, M.; GREENBERG, B. House fly and *Drosophila* cell cultures as hosts for human enteroviruses. **Journal of Medical Entomology**, v. 4, p. 428-432, 1974.

KNOWLES, N.J.; HOVI, T.; HYYPIÄ, T.; KING, A.M.Q.; LINDBERG, M.; PALLANSCH, M.A.; PALMENBERG, A.C.; SIMMONDS, P.; SKERN, T.; STANWAY, G.; YAMASHITA, T. AND ZELL, R. *Picornaviridae*. In: Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. and Lefkowitz, E.J. San Diego: Elsevier, p. 855-880. 2011.

KORIMBUCUS, J. *et al.* DNA probe array for the simultaneous identification of herpesviruses, enteroviruses and flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 43, p. 3779-3787, 2005.

LaMONICA, N.; MERIAM, C.; RACANIELLO, V. R. Mapping of sequences required for mouse neurovirulence of poliovirus type 2 Lansing. **Journal of Virology**, Washington, v. 57, p. 515-25, 1986.

LAKEMAN, F. D. *et al.* Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsed patients and correlation with disease. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 171, p. 857-863, april 1995.

LAMARÃO, L. M.; MACIEL, A. M.; GOMES, L. C. First isolation of enterovirus 71 (EV-71) from Northern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 4, p. 278-281, 2003.

LAMARÃO, L. M. *et al.* Pesquisa de enterovírus em casos de síndrome de meningite asséptica de Belém, PA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 5, p. 391-395, 2005.

LEE, B. E.; DAVIES, H. D. Aseptic meningitis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Sheffield, v. 20, p. 272-277, 2007.

LEWIS, H.; GIBBON, F. M. Management of viral meningitis and encephalitis. **Current Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 10, p. 110-115, 2000.

LIN, M. C. *et al.* Epidemiology and diagnostic methodology for enterovirus infection, including cerebrospinal fluid analysis: a 5-year review. **The Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taiwan, v. 41, p. 450-455, 2008.

LINDBERG, A. M.; STALHANDSKE, P. O.; PETTERSSON, U. Genome of Coxsackievirus B3. **Virology**, London, v. 156, p. 50-63, 1987.

LIPTON, H. L.; GILDEN, D. H. Viral diseases of the nervous system: persistent infections. In: NATHANSON, N. **Viral Pathogenesis**. 1. ed. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1997. p. 855-866.

LOGOTHETI, M. *et al.* Laboratory investigation and phylogenetic analysis of enteroviruses involved in an aseptic meningitis outbreak in Greece during the Summer of 2007. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 46, p. 270-274, 2009.

LUCHS, A. *et al.* Evaluation of enterovirus 71 immune status in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 52, p. 339-341, 2010.

LUKASHEV, A. N. Recombination among picornaviruses. **Reviews in Medical Virology**, London, v. 20, p. 327-337, 2010.

MACHADO, B. C. *et al.* Aseptic meningitis by echovirus 30 in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 97-102, 2007.

MARKOULATUS, P. *et al.* Laboratory diagnosis of common herpesvirus infections of the central nervous system by multiplex PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 39, p. 4426-4432, 2001.

McIVER, C. J. *et al.* Development of multiplex PCRs for detection of common viral pathogens and agents of congenital infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 10, p. 5102-5110, 2005.

MELNICK, J. L. *et al.* Picornaviridae. **Intervirology**, Leipzig, v. 4, n. 5, p. 303-316, 1974.

MENDONZA, L. P. *et al.* Viral infections of the central nervous system in Brazil. **Journal of Infection**, London, v. 54, n. 6, 2006.

MEYER JUNIOR, H. M. *et al.* Central nervous system syndromes of viral etiology: a study of 713 cases. **American Journal of Medicine**, Tucson, v. 29, p. 334-347, 1960.

MICHOS, A. G. *et al.* Aseptic meningitis in children: analysis of 506 cases. **PLoS ONE**, v. 8, p. 674, 2007.

MICROBIOLOGY BYTES. **Picornaviruses**. Set. 2007. Disponível em: <<http://www.microbiologybytes.com/virology/Picornaviruses.html>>. Acesso em: 10 set. 2011.

MINJOLLE, S. *et al.* Detection of herpesvirus genomes by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid and clinical findings. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 25, S59-S70, 2002.

MINOR, P. D.; MORGAN-CAPNER, P.; MUIR, P. Enteroviruses. In: ZUCHERMAN, A. J.; BANATVALA, J. E.; PATTISON J. R. **Principles and practice of clinical virology**. England: John Wiley & Sons Ltd., 2000. p. 427-449.

MIRAND, A. *et al.* Enterovirus genotyping directly from original clinical specimens: prospective application to a severe neonatal infection. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 44, p. 177-8, 2009.

MOREIRA R. C. *et al.* Na exanthematic disease epidemic associated with coxsackie B3 infection in a day care center. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 3, p. 235-238, 1995.

MUIR, P. *et al.* Molecular typing of enteroviruses: current status and future requirements. **Clinical Microbiology Reviews**, Pennsylvania, v. 11, n. 1, p. 202-227, 1998.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford University Press, New York, 2000.

NELSON, N. *et al.* The diagnostic and predictive value of cerebrospinal fluid lactate in children with meningitis. Its relation current diagnostic methods. **Acta Paediatrica Scandinavica**, Stockholm, v. 1, p. 52-57, 1986.

NERY-GUIMARÃES, R.; BITTENCOURT, L. C. M.; PASTOR, M. V. A. As meningites virais no município do Rio de Janeiro, RJ (Brasil), 1978. **Revista de Saúde Pública de São Paulo**, São Paulo, v. 15, p. 455-71, 1981.

NEWTON, C. **Aseptic meningitis**. 1999. Disponível em: <<http://www.med.unc.edu/medicine/web/meningitis.htm>>. Acesso em: 1 set. 2011.

NIGROVIC, L. E.; KUPPERMANN, N.; MALLEY, R. Development and validation of a multivariable predictive model to distinguish from aseptic meningitis in children in the post-*Haemophilus influenza* era. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 110, p. 712-719, 2002.

NIX, W. A.; OBERSTE, M. S.; PALLANSCH, M. A. Sensitive, seminested PCR amplification of VP1 sequences for direct identification of all enterovirus serotypes from original clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 44, p. 2698-2704, 2006.

NOORDHOEK, G. T. *et al.* Clinical validation of a new real-time PCR assay for detection of enteroviruses and parechoviruses, and implications for diagnostic procedures. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 41, p. 75-80, 2008.

OBERSTE, M. S.; MAHER, K.; PALLANSCH, M. A. Molecular phylogeny of all human enterovirus serotypes based on comparison of sequences at the 5' end of the region encoding VP2. **Virus Research**, Suffolk, v. 58, p. 35-43, 1998.

OBERSTE, M. S. *et al.* Typing of human enteroviruses by partial sequencing of VP1. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 37, p. 1288-1293, 1999a.

OBERSTE, M. S. *et al.* Molecular evolution of human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. **Journal of Virology**, Washington, v. 73, p. 1941-1948, 1999b.

OBERSTE, M. S. *et al.* Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 37, n. 12, p. 3928-3933, 1999c.

OBERSTE, M. S. *et al.* Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypable enteroviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 1170-1174, 2000.

OBERSTE, M. S. *et al.* Improved molecular identification of enteroviruses by RT-PCR and amplicon sequencing. **Journal of Virology**, Washington, v. 26, p. 375-377, 2003.

OBERSTE, M. S. *et al.* Complete genome sequences of all members of the species human enterovirus A. **Journal of General Virology**, London, v. 85, p. 1597-1607, 2004.

OLIVAL, K. J.; DASZAK, P. The ecology of emerging neurotropic viruses. **Journal of Neurovirology**, Houndmills, v. 5, p. 441-446, 2005.

OOSTENBRINK R. *et al.* Signs of meningeal irritation at the emergency department: how often bacterial meningitis? **Pediatric Emergency and Care**, v. 17, p. 161-164, 2001.

PALACIOS, G. *et al.* Molecular identification of enterovirus by analyzing a partial VP1 genomic region with different methods. **Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 182-192, jan. 2002.

PALLANSCH, M. A.; ROOS, R. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

PANACCIO, M.; LEW, A. PCR based diagnosis in the presence of 80/ (v/v) blood. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 1151, 1991.

PARANÁ. Secretaria Estadual de Saúde. **Série histórica meningites** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <lrrvidal@yahoo.com.br> em 1 set. 2011.

PEIGUE-LAFEUILLE, H. *et al.* From prospective molecular diagnosis of enterovirus meningitis to the prevention of antibiotic resistance. **Médecine et Maladies Infectieuses**, Paris, v. 36, p. 124-31, 2006.

PESSA, L. F. C. **Infecções pelo vírus da família *Herpesviridae* no sistema nervoso central**. Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes. 180 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

PEVEAR, D. C. *et al.* Localization of genomic regions specific for the attenuated mouse-adapted poliovirus type 2 strain W2. **Journal of General Virology**, London, v. 71, p. 43-52, 1990.

Picornaviridae study group. Human parechoviruses. Disponível em: <http://www.picornastudygroup.com/types/parechovirus/hpev.htm>. Acesso em Outubro, 2011.

PIÑEIRO, L. *et al.* Human parechoviruses in infants with systemic infection. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 82, p. 1790-1796, 2010.

PÖYRY, T. *et al.* Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. **Journal of General Virology**, London, v. 77, p. 1699-1717, 1996.

POZO, F. *et al.* Evaluation of a commercially available reverse transcription-PCR assay for diagnosis of enteroviral infection in archival and prospectively collected cerebrospinal fluid specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 36, p. 1741-1745, 1998.

POZO, F.; TENORIO, A. Detection and typing of lymphotropic herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, London, v. 79, p. 9-19, 1999.

RACANIELLO, V. Picornaviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

RAMERS, C. *et al.* Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. **The Journal of the American Medical Association**, v. 283, p. 2680-2685, 2000.

READ, S.; MITCHELL, J.; FINK, C. LightCycler Multiplex PCR for the laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 39, n. 9, p. 3056-3059, 2001.

ROTBART, H. A. *et al.* Diagnosis of enterovirus infection by polymerase chain reaction of multiple specimen types. Brief reports. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 16, n. 4, p. 409-411, 1997.

ROMERO, J. R.; NEWLAND, J. G. Viral meningitis and encephalitis: traditional and emerging viral agents. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 14, p. 72-82, 2003.

RYAN, M. D. *et al.* The complete nucleotide sequence of enterovirus type 70: relationships with other members of the *picornaviridae*. **Journal of General Virology**, London, v. 71, p. 2291-2299, 1990.

SABIN, A. B. Behavior of chimpanzee-avirulent poliomyelitis viruses in experimental infected human volunteers. **American Journal of the Medical Science**, n. 230, p. 1-8, 1955.

SALK, J. E. Recent studies in immunization against poliomyelitis. **Pediatrics**, Elk Grove Village, n. 12, p. 471-482, 1953.

SANTOS, G. P. I. *et al.* **Journal of Medical Virology**, New York, v. 78, p. 98-104, 2006.

SAWYER, M. *et al.* Diagnosis of enteroviral central nervous system infection by polymerase chain reaction during a large community outbreak, **Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 13, n. 3, p. 177-82, 1994.

SAWYER, M. H. Enterovirus infections: diagnosis and treatment. **Seminars in Pediatrics Infectious Diseases**, v. 53, p. 40-47, 2002.

SEEHUSEN, D. A.; REEVES, M. M.; FOMIN, D. A. Cerebrospinal fluid analysis. **American Family Physician**, v. 68, p. 1103-1108, 2003.

SHOJA, Z. *et al.* Detection of enteroviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in cell culture negative stool specimens of patients with acute flaccid paralysis. **Journal of Virological Methods**, London, v. 142, p. 95-97, 2007.

SILVA, E. E. *et al.* Evidence of enterovirus 71 infections in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 131-132, 1990.

SILVA, E. E.; WINKLER, M. T.; PALLANSCH, M. A. Role of enterovirus 71 in acute flaccid paralysis after the eradication of poliovirus in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 2, p. 231-233, 1996.

SINDIC, C. J. M.; VAN ANTWERPEN, M. P.; GOFFETTE, S. Clinical relevance of polymerase chain reaction (PCR) assays and antigen-driven immunoblots for the diagnosis of neurological infectious diseases. **Brain Research Bulletin**, v. 61, p. 299-308, 2003.

SPANOS, A.; HARRELL, F. E.; DURACK, D. T. Differential diagnosis of acute meningitis. **JAMA**, v. 262, p. 2700-2707, 2003.

STANWAY, G. *et al.* Comparison of the complete nucleotide sequences of the genomes of the neurovirulent poliovirus P5/Leon/37 and its attenuated Sabin vaccine derivative P3/Leon12a1b. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 81, p. 1539-1543, 1984.

STANWAY, G.; KALKKINEN, N.; ROIVAINEN, N. Molecular and biological characteristics of echovirus 22, a representative of a new picornavirus group. **Journal of Virology**, Washington, v. 68, p. 8232-8238, 1994.

STANWAY, G.; HYYPIÄ, T. Parechoviruses. **Journal of Virology**, Washington, v. 53, p. 5249-54, 1999.

STANWAY, G.; JOKI-KORPELA, P.; HYYPIÄ, T. Human parechoviruses – biology and clinical significance. **Reviews of Medical Virology**, v. 10, p. 57-69, 2000.

SUPANARANOND, K.; TAKEDA, N.; YAMAZAKI, S. The complete nucleotide sequence as a variant of Coxsackievirus A24, an agent causing acute hemorrhagic conjunctivitis. **Virus Genes**, v. 6, p. 149-158, 1992.

TAFRESHI, N. K. *et al.* **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam. v. 32, p. 318-324, 2005.

TAKAMI, T. *et al.* Determination of enterovirus serotype inferred from sequence analysis of PCR products. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam. v. 26, p. 355-359, 2003.

TAKAVOLI, N. P. *et al.* Detection and typing of enteroviruses from CSF specimens from patients diagnosed with meningitis/encephalitis. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam. v. 43, p. 207-211, 2008.

TAKIMOTO, S. *et al.* Enterovirus infection and acute neurological disease among children in Brazil. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, p. 25-28, 1998.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, p. 512-526, 1993.

TAMURA, K. *et al.* Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TANEL, R. E. *et al.* Prospective comparison of culture vs genome detection for diagnosis of enteroviral meningitis in childhood. **Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine**, v. 150, p. 919-24, 1996.

TANG, Y. *et al.* Effective use of polymerase chain reaction for diagnosis of central nervous system infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 803-6, 1999.

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000.

TIETZ, N. W. **Clinical guide to laboratory tests**. 3. ed. Philadelphia: N. B. Saunders Company, 1995.

TOYODA, H. *et al.* Complete sequences of all three poliovirus serotype genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 128, p. 561-585, 1984.

TRALLERO, G. *et al.* enteroviruses in Spain: virological and epidemiological studies over 10 years (1988-97). **Epidemiology Infectious**, v. 124, p. 497-506, 2000.

TRALLERO, G. *et al.* First epidemic of aseptic meningitis due to echovirus type 13 among Spanish children. **Epidemiology Infectious**, v. 130, p. 251-256, 2003.

TSACOPOULOS, M.; MAGISTRETTI, P. J. Metabolic coupling between glia and neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 3, p. 877- 885, 1996.

TYLER, K. L.; GONZALES-SCARANO, F. Viral diseases of the nervous system acute infections. In: NATHANSON, N. **Viral Pathogenesis**. 1. ed. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1997.

TYLER, K. L. Emerging viral infections of the central nervous system. Part 1. **Archives of Neurology**, v. 8, p. 939-948, 2009.

VAN DER SANDEN. *et al.* Prevalence of human parechovirus in Netherlands in 2000 to 2007. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 46, p. 2884-2889, 2008.

VERSTREPEN, W. A. *et al.* Rapid detection of enterovirus RNA in cerebrospinal fluid specimens with a novel single-tube real-time reverse transcription PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 39, p. 4093-4096, 2001.

VIDAL, L. R. *et al.* Enterovirus and herpesviridae family as etiologic agents of lymphomonocytary meningitis, Southern Brazil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 69, p. 475-81, 2011.

VILLARRUEL, G. R. *et al.* Nonpolio enterovirus and human parechovirus surveillance – United States, 2006–2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, Atlanta, 59, p. 1577-1580, 2010.

VOKSHOOR, A.; MOORE, L. **Viral meningitis**. Disponível em: <<http://www.emedicine.com/neuro/topic607.htm>>. Acesso em: 17 fev. 2007.

VRIES, M. *et al.* Human parechoviruses type 1, 3, 4, 5 and 6 detection picornavirus cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, Amsterdam, v. 46, p. 759-762, 2008.

WATANABE K. *et al.* Isolation and characterization of novel human parechovirus from clinical samples. **Emerging of Infectious Diseases**, Atlanta, v. 13, p. 889-95, 2007.

WILDIN, S.; CHONMAITREE, T. The importance of the virology laboratory in the diagnosis and management of viral meningitis. **American Journal Diseases of Children**, New York, v. 141, p. 454-457, 1987.

WOLTERS, K. C. *et al.* Human parechoviruses as an important viral cause of sepsis like illness and meningitis in young children. **Clinical of Infectious Diseases**, Oxford, v. 47, p. 358-363, 2009.

ZHANG, G. *et al.* Complete nucleotide sequence of a coxsackie B5 virus and its relationship to swine vesicular disease virus. **Journal of General Virology**, London, v. 74, p. 845-853, 1993.

ZIMMERLI, W. How to differentiate bacterial from viral meningitis. **Intensive Care of Medicine**, Roma, v. 31, p. 1608-1610, 2005.

ANEXO 1
CARTA COMISSÃO DE ÉTICA



HOSPITAL DE CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Curitiba, 07 de junho de 2005.

Ilmo (a) Sr. (a)
Luine Rosele Renaud Vidal Tsuchiya
Nesta

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA ETIOLOGIA DAS MENINGITES ASSÉPTICAS/VIRAIS NO MUNICÍPIO DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA DO ESTADO DO PARANÁ", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 31 de maio de 2005. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0048.1.208.000-05
Protocolo CEP: 1038.077/2005-05

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 07 de dezembro de 2005.

Atenciosamente,

Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 2
FICHA EPIDEMIOLÓGICA

MENINGITE

Meningite OBS: Esta ficha deve ser utilizada para casos notificados pelos DS Matriz e Santa Felicidade a partir de junho de 2005

SMS - Curitiba 1.1 AMOR 27/05/05

Dados do Laboratório	43 Punção Lombar <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado		44 Data da Punção <u>26/11/2005</u>		45 Aspecto do Líquor 1 - Límpido 2 - Purulento 3 - Hemorrágico <input type="checkbox"/> 4 - Turvo 5 - Xantocrômico 6 - Outro 9 - Ignorado																																				
	46 Realizou Citoquímica <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado		47 Se Afirmativo 1-Hemáceas <u>47</u> mm ³ 2-Leucócitos <u>8</u> mm ³ 3-Monócitos _____ % 4-Neutrófilos _____ % 5-Eosinófilos _____ % 6-Linfócitos _____ % 7-Glicose _____ mg 8-Proteínas _____ mg 9-Cloreto _____ mg																																						
	48 Preencher com Resultado (nome completo - não abreviar). Consultar Tabela Anexa ao Manual para Digitação.																																								
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Exames</th> <th>Bacterioscopias</th> <th>Cultura</th> <th>Cief</th> <th>Aglutinação por Látex</th> <th>Outro Exame</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Líquor</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Lesão Petequial</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Sangue/Soro</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Escarro</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Outro</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>						Exames	Bacterioscopias	Cultura	Cief	Aglutinação por Látex	Outro Exame	Líquor						Lesão Petequial						Sangue/Soro						Escarro						Outro				
Exames	Bacterioscopias	Cultura	Cief	Aglutinação por Látex	Outro Exame																																				
Líquor																																									
Lesão Petequial																																									
Sangue/Soro																																									
Escarro																																									
Outro																																									
Tratamento	49 Doença Meningocócica Sorogrupo _____ Sorotipo _____ Subtipo _____																																								
	50 Tipável 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-Ignorado 51 Tipado 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-Ignorado																																								
	52 Antibiótico Usado 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-Ignorado																																								
	53 Penicilina <input type="checkbox"/> 2-Clorafenicol <input type="checkbox"/> 3-Gentamicina <input type="checkbox"/> 4-Tuberculostáticos <input type="checkbox"/> 54 Ampicilina <input type="checkbox"/> 5-Cefalosporina <input type="checkbox"/> 6-Amicacina <input type="checkbox"/> 7-Outras _____																																								
Medidas de Controle	55 Número de Comunicantes _____																																								
	56 Realizada Quimioprofilaxia dos Comunicantes? 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-Ignorado <input type="checkbox"/>																																								
	57 Vacinação de Bloqueio 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-Ignorado <input type="checkbox"/>																																								
	58 Qual a Vacina Utilizada 1-A/C <input type="checkbox"/> 2-C <input type="checkbox"/> 3-B/C <input type="checkbox"/> 4-Hemófilos 5-Pneumococo 6-Outra _____																																								
Conclusão	59 Iniciais do Nome _____ Idade H-Horas _____ D-Dias _____ M-Meses _____ A-Anos _____																																								
	60 Quimioprofilaxia 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-Ignorado <input type="checkbox"/>																																								
	61 Tipo de Contato 1-Escolar <input type="checkbox"/> 2-Profissional <input type="checkbox"/> 3-Domiciliar <input type="checkbox"/>																																								
	62 Antecedente Vacinais Meningocócicas 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-Ignorado <input type="checkbox"/>																																								
63 Antecedente Vacinais Anti-Hemófilos 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-Ignorado <input type="checkbox"/>																																									
64 Classificação Final 1 - Confirmado <input type="checkbox"/> 2 - Descartado																																									
65 Se Confirmado, Especifique 1 - Meningococcemia 2 - Meningite Meningocócica 3 - Meningite Meningocócica com Meningococcemia 4 - Meningite Tuberculosa 5 - Meningite Bacteriana 6 - Meningite Não Especificada 7 - Meningite Viral 8 - Meningite de Outra Etiologia 9 - Meningite por Hemófilos 10 - Meningite por Pnemococos 11 - Meningite pós vacinal																																									
66 Critério de Confirmação 1 - Cultura 2 - CIEF 3 - Ag. Latex 4 - Clínico 5 - Bacterioscopia 6 - Necrópsia 7 - Prova Terapêutica 8 - Vínculo Epidemiológico 9 - Citoquímica 10 - Outro 11 - At. Óbito 12 - PCR																																									
67 Doença Relacionada ao Trabalho 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado <input type="checkbox"/>																																									
68 Evolução do Caso 1 - Alta 2 - Óbito 9 - Ignorado																																									
69 Data da Evolução _____																																									
70 Se Alta, Teve Sequela 1 - Sim <input type="checkbox"/> 2 - Não <input type="checkbox"/> 9 - Ignorado <input type="checkbox"/>																																									
71 Se Sim, Qual: _____																																									
72 Data do Encerramento _____																																									
Observações																																									
Investigador																																									
68 Município/Unidade de Saúde _____																																									
69 Código Unid. de Saúde _____																																									
70 Nome _____																																									
71 Função _____																																									
72 Assinatura _____																																									

ANEXO 3

PONTUAÇÃO PARA MENINGITES BACTERIANAS CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO PARA MENINGITES VIRAIS

Utilizou-se o critério descrito por Nigrovic *et al*(2002), elaborado com o objetivo de desenvolver e validar um modelo multivariável para distinção entre meningites bacteriana das meningites assépticas em crianças utilizando-se parâmetros avaliados no momento da apresentação do paciente, de acordo com a tabela abaixo.

Pontuação para Meningites Bacterianas

Característica	Pontuação	
	Presente	Ausente
Coloração de Gram Positiva	2	0
Proteinorraquia ≥ 80 mG/dL	1	0
Contagem de Neutrófilos no sangue periférico ≥ 10.000 células/mm ³	1	0
Convulsão no momento ou antes da apresentação	1	0
Contagem de Neutrófilos no LCR ≥ 1.000 células/mm ³	1	0

*Possibilidades de Pontuação de 0 – 6

Os resultados obtidos identificaram acuradamente crianças com baixo risco para meningite bacteriana (Pontuação = 0) ou de alto risco (Pontuação ≥ 2).

Brivet *et al*(2005) utilizaram o modelo de regressão logística para diferenciação das meningites. Eram consideradas meningites bacterianas pacientes que preenchiam dois dos seguintes critérios: 1. Coloração de Gram positiva para bactéria; 2. pleocitose no LCR (> 7 leucócitos/mm³); 3 Cultura para bactérias positiva do LCR; 4 Teste de aglutinação do látex ou PCR positiva para *N. meningitidis*. Os casos de meningites virais foram definidos como: 1 Pacientes com pleiocitose no LCR pelo menos 7 leucócitos/mm³; 2 Ausência de qualquer crescimento bacteriano na cultura do LCR; 3 Curso clínico rápido e benigno; 4 nenhuma outra etiologia que infecção viral.

Observação: Para o presente estudo adotou-se um conjunto de critérios estabelecidos pelos autores e descritos acima. Não foi utilizado o critério de contagem absoluta de leucócitos no sangue periférico.

APÊNDICE 1

PROTOCOLOS PCR



PROTOCOLO MENINGITES VIRAIS
PCR PARA ENTEROVIRUS

Data: Técnico:

	AMOSTRA		POSIÇÃO GEL (PENTE 8)		POSIÇÃO GEL (PENTE 14)
1		1		1	
2		2		2	
3		3		3	
4		4		4	
5		5		5	
6		6		6	
7		7		7	
8		8		8	
9		9		9	
10		10		10	
11		11		11	
12		12		12	
13		13		13	
14		14		14	

PCR: Master Mix

Reagentes	1º PCR (2,5 µl cDNA)	Reagentes	2º PCR (0,5 µl DO 1º PCR)
H ₂ O Nuclease Livre	9,9 µL x ____ =	H ₂ O Nuclease Livre	12 µL x ____ =
10 x Tampão	2,5 µL x ____ =	10 x Tampão	2,5 µL x ____ =
dNTP 2,5 mM	8 µL x ____ =	dNTP 2,5 mM	8 µL x ____ =
MgCl ₂ 50mM	0,75 µL x ____ =	MgCl ₂ 50mM	0,75 µL x ____ =
Iniciadores + (10pmol/µl)	EV1+ 0,5 µL x ____ =	Iniciadores + (10pmol/µl)	EV2+ 0,5 µL x ____ =
Iniciadores - 10pmol/µl	EV1- 0,5 µL x ____ =	Iniciadores - 10pmol/µl	EV2- 0,5 µL x ____ =
Iniciadores Controle Interno + (10pmol/µl)	PRV1+ 0,5 µL x ____ =	Iniciadores Controle Interno + (10pmol/µl)	PRV2+ 0,5 µL x ____ =
Iniciadores Controle Interno - (10pmol/µl)	PRV1- 0,5 µL x ____ =	Iniciadores Controle Interno + (10pmol/µl)	PRV2- 0,5 µL x ____ =
Taq Polimerase (5U/µl)	0,35 µL x ____ =	Taq Polimerase (5U/µl)	0,25 µL x ____ =
Volume final 25 µl		Volume final 25 µl	

1º PCR

Programa Termociclagem: 94º 2 min + 40 ciclos (94º 30 s; 48º 30 s; 72º 2 min) + 72º 10 min + 4º
sempre

Produtos Esperados: Enterovírus: 502-506 pb

2º PCR

Programa Termociclagem: 94º 2 min + 30 ciclos (94º 30 s; 52º 30 s; 72º 1 min) + 72º 10 min + 4º
sempre

Produtos Esperados: Enterovírus: 306-311 pb

Controle Interno: 140 pb



PCR PARA TIPAGEM ENTEROVIRUS

Data: Técnico:

	AMOSTRA		POSIÇÃO GEL (PENTE 8)		POSIÇÃO GEL (PENTE 14)
1		1		1	
2		2		2	
3		3		3	
4		4		4	
5		5		5	
6		6		6	
7		7		7	
8		8		8	
9		9		9	
10		10		10	
11		11		11	
12		12		12	
13		13		13	
14		14		14	

PCR: Master Mix

Reagentes	PCR EV12 (2,5 µl cDNA)	Reagentes	PCR EV40 (2,5 µl DO cDNA)
H ₂ O Nuclease Livre	14,15 µL x ____ =	H ₂ O Nuclease Livre	14,15 µL x ____ =
10 x Tampão	2,5 µL x ____ =	10 x Tampão	2,5 µL x ____ =
dNTP 2,5 mM	4 µL x ____ =	dNTP 2,5 mM	4 µL x ____ =
MgCl ₂ 50mM	0,75 µL x ____ =	MgCl ₂ 50mM	0,75 µL x ____ =
Iniciadores EV12 (10pmol/µl)	0,5 µL x ____ =	Iniciadores EV40 (10pmol/µl)	0,5 µL x ____ =
Iniciadores EV11 (10pmol/µl)	0,5 µL x ____ =	Iniciadores EV11 (10pmol/µl)	0,5 µL x ____ =
Taq Polimerase (5U/µl)	0,35 µL x ____ =	Taq Polimerase (5U/µl)	0,35 µL x ____ =

Programa Termociclagem EV12: 94° 2 min + 40 ciclos (94° 30 s; 48° 30 s; 72° 2 min) + 72° 10 min + 4° sempre

Programa Termociclagem: EV40 94° 2 min + 30 ciclos (94° 30 s; 52° 30 s; 72° 1 min) + 72° 10 min + 4° sempre

Produtos Esperados: aproximadamente 450 pb

APÊNDICE 2
TABELA DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
1	1252/05	18/07/2005	20/07/2005	HUEC	1a	F	1400	6	0	0	0	0	76	18	2,10
2	1249/05	21/07/2005	21/07/2005	HUEC	7m	M	0	5	NI	NI	0	0	NI	NI	2,30
3	1250/05	NI	27/07/2005	HUEC	85a	F	0	5	0	0	0	0	NI	NI	2,80
4	1251/05	27/07/2005	27/07/2005	HUEC	1a	M	0	5	0	0	0	0	NI	NI	3,50
5	1292/05	12/08/2005	12/08/2005	HC	1a5m	M	83	85	41	8	0	51	84	47	1,00
6	1310/05	NI	15/08/2005	HUEC	05m	M	0	5	0	1	0	99	NI	NI	1,38
7	1309/05	NI	15/08/2005	HUEC	31a	M	166	5	0	0	0	0	49	133	2,20
8	1363/05	NI	25/08/2005	HUEC	01m	M	0	5	0	0	0	0	NI	NI	1,9
9	1462/05	NI	12/09/2005	HUEC	01m	F	0	5	0	0	0	0	NI	NI	1,8
10	1540/05	23/09/2005	23/09/2005	HC	32a	F	0	456	0	0	0	0	68	109	1,80
11	1591/05	26/09/2005	26/09/2005	HUEC	7a	F	12	5	0	3	0	97	36	94	1,30
12	1592/05	25/09/2005	30/09/2005	HUEC	1a	F	74	5	0	0	0	0	71	21,7	1,40
13	1723/05	NI	24/10/2005	HUEC	1a	M	2400	10	0	0	0	0	73	46,2	2,10
14	1770/05	28/10/2005	31/10/2005	HUEC	1a	F	285	5	0	0	0	0	70	22	1,70
15	1804/05	26/10/2005	02/11/2005	HPP	3a	F	1728	24	0	0	0	22	40	58	1,50
16	1788/05	NI	03/11/2005	HUEC	14a	M	70	60	1	0	0	99	579	287	1,60
17	1805/05	02/11/2005	03/11/2005	HPP	9m	M	17493	106	76	24	0	0	74	42	1,80
18	1806/05	03/11/2005	03/11/2005	HPP	2a	F	1	38	40	0	0	60	49	49	1,60
19	1807/05	03/11/2005	03/11/2005	HPP	3a	M	27	41	100	0	0	0	71	54	2,30
20	1808/05	01/11/2005	03/11/2005	HPP	8m	F	170	26	20	0	0	0	56	19	1,90
21	1826/05	31/10/2005	04/11/2005	HPP	4a	M	1	1621	97	3	0	0	19	46	3,10
22	1827/05	03/11/2005	04/11/2005	HPP	5m	M	69	336	100	0	0	0	105	70	2,60
23	1828/05	04/11/2005	05/11/2005	HPP	3m	M	13	17	14	0	0	0	45	68	2,80
24	1829/05	04/11/2005	05/11/2005	HPP	5m	F	1	53	100	0	0	0	49	64	1,80
25	1830/05	05/11/2005	05/11/2005	HPP	5a	M	3242	30	6	6	0	94	63	69	2,90
26	1834/05	05/11/2005	05/11/2005	HC	1a	M	35	108	0	0	0	90	2,4	4,6	2,20
27	1831/05	05/11/2005	06/11/2005	HPP	6a	M	5	34	100	0	0	0	57	37	2,20
28	1832/05	04/11/2005	06/11/2005	HPP	6a	M	1109	9	6	0	0	0	56	45	2,40
29	1835/05	NI	07/11/2005	HUEC	8a	F	4	9	0	0	0	0	64	37	2,70
30	1836/05	NI	07/11/2005	HUEC	9m	M	110	5	NI	NI	0	0	68	24,2	1,90
31	1837/05	NI	07/11/2005	HUEC	2a	M	26	5	0	0	0	0	63	17,8	1,40
32	1853/05	05/11/2005	07/11/2005	HPP	12a	M	3	52	100	0	0	0	71	120	2,90

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
33	1854/05	30/10/2005	07/11/2005	HPP	3a	M	1	34	0	0	0	0	43	77	1,70
34	1855/05	04/11/2005	08/11/2005	HPP	13a	F	96	16	0	0	0	0	35	107	2,70
35	1856/05	07/11/2005	08/11/2005	HPP	12a	F	2	625	90	10	0	0	67	85	2,30
36	1857/05	07/11/2005	08/11/2005	HPP	6a	M	1	576	100	0	0	0	73	75	2,70
37	1858/05	NI	08/11/2005	HPP	5a	M	64	661	90	10	0	0	67	79	2,10
38	1859/05	03/11/2005	08/11/2005	HPP	4m	M	170	896	0	0	0	0	725	33	3,00
39	1871/05	08/11/2005	09/11/2005	HPP	2a	F	8	129	0	0	0	0	83	42	2,00
40	1872/05	08/11/2005	09/11/2005	HPP	5a	F	0	218	0	0	0	0	44	51	2,70
41	2447/05	09/11/2005	10/11/2005	HPP	3a	F	96	128	100	0	0	0	76	70	3,10
42	2449/05	08/11/2005	10/11/2005	HPP	5a	M	2	17	9	0	0	0	65	43	1,30
43	2450/05	10/11/2005	10/11/2005	HPP	2a	M	0	10	0	0	0	0	56	38	1,40
44	2485/05	13/11/2005	14/11/2005	HPP	8a	M	955	110	100	0	0	0	58	91	2,60
45	2486/05	13/11/2005	14/11/2005	HPP	8m	F	1,3	17	14	0	0	0	68	31	1,40
46	2487/05	14/11/2005	15/11/2005	HPP	1a	M	1	201	0	0	0	0	61	68	2,00
47	2488/05	14/11/2005	15/11/2005	HPP	5a	F	48	140	0	0	0	0	94	44	2,00
48	2504/05	16/11/2005	17/11/2005	HPP	3a	M	1	101	100	0	0	0	58	81	2,70
49	2505/05	15/11/2005	17/11/2005	HPP	6a	M	8	87	0	0	0	0	53	64	2,00
50	2506/05	15/11/2005	17/11/2005	HPP	2a	F	42	165	0	0	0	0	52	94	1,60
51	2538/05	20/11/2005	20/11/2005	HPP	12a	F	4	54	0	0	0	0	54	142	2,30
52	2539/05	20/11/2005	21/11/2005	HPP	7a	M	13	608	95	5	0	0	103	64	2,50
53	2540/05	16/11/2005	21/11/2005	HPP	7a	M	0	84	100	0	0	0	61	69	1,90
54	2541/05	20/11/2005	21/11/2005	HPP	8m	M	12	170	0	0	0	0	58	64	2,20
55	2542/05	NI	22/11/2005	HC	3m	F	1765	23	9	42	0	49	68	59	2,20
56	2555/05	18/11/2005	22/11/2005	HPP	1a	M	2	42	0	0	0	0	70	97	1,90
57	2556/05	20/11/2005	22/11/2005	HPP	4a	F	0	97	100	0	0	0	50	72	2,30
58	2567/05	22/11/2005	23/11/2005	HPP	5a	M	8	61	100	0	0	0	64	35	1,60
59	2568/05	21/11/2005	23/11/2006	HPP	5a	F	661	297	92	8	0	0	47	50	2,30
60	2569/05	22/11/2005	23/11/2006	HPP	4a	M	1	477	0	0	0	0	58	60	3,10
61	2566/05	22/11/2005	24/11/2005	HPP	9a	F	1	136	100	0	0	0	52	191	2,60
62	2600/05	25/11/2005	25/11/2006	HPP	1a	M	9	354	100	0	0	0	78,2	66	2,30
63	2601/05	24/11/2005	25/11/2006	HPP	4a	F	1	58	100	0	0	0	79	63	2,50
64	2602/05	24/11/2005	26/11/2006	HPP	3a	F	1	69	100	0	0	0	85	59	2,70

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
65	2603/05	24/11/2005	26/11/2006	HPP	10m	M	10	134	100	0	0	0	56	50	1,80
66	2645/05	23/12/2005	24/11/2005	HPP	6a	M	2	1102	100	0	0	0	54	109	MI
67	2582/05	NI	25/11/2005	HPP	5m	M	1	7	0	0	0	0	52	82	1,20
68	2609/05	NI	28/11/2005	HUEC	6a	F	2	8	0	0	0	0	52	30	1,90
69	2610/04	NI	28/11/2005	HUEC	7a	M	9	5	NI	NI	0	0	71	21,4	1,90
70	2618/05	26/11/2005	28/11/2005	HPP	2a	M	2	235	0	0	0	0	62	89	2,50
71	2646/05	29//11/2005	29/11/2006	HPP	6a	M	1	7	100	0	0	0	85	67	2,10
72	2647/05	25/11/2005	30/11/2006	HPP	2a	M	1	36	100	0	0	0	61	38	1,80
73	2690/05	03/12/2005	04/12/2005	HPP	1a	F	3	15	0	0	0	0	65	39	MI
74	2724/05	05/12/2005	07/12/2005	HPP	6m	F	130	8	0	0	0	0	68	12	2,00
75	2726/05	06/12/2005	07/12/2005	HPP	4a	M	9	196	1	0	0	99	66	41	3,10
76	2727/05	07/12/2005	08/12/2005	HPP	0	M	1386	256	0	0	0	0	NI	NI	1,83
77	2761/05	08/12/2005	09/12/2005	HPP	3a	M	631	30	1	0	0	99	54	30	2,20
78	2762/05	05/12/2005	09/12/2005	HPP	2a	F	0,6	10	6	0	0	94	71	17	2,20
79	2763/05	08/12/2005	09/12/2005	HPP	2a	M	1	60	1	0	0	99	55	27	2,00
80	2764/05	05/12/2005	10/12/2005	HPP	5a	F	5	234	0	0	0	0	58	44	2,40
81	2765/05	09/12/2005	11/12/2005	HPP	23d	M	0	6	0	0	0	0	45	74	1,60
82	2767/05	NI	11/12/2006	HPP	4a	F	5	186	0	0	0	0	49	46	2,30
83	2768/05	06/12/2005	11/12/2006	HPP	7a	F	2	426	0	0	0	0	53	50	1,70
84	2782/05	11/12/2005	12/12/2006	HPP	5a	M	1	324	1	0	0	99	59	15	1,80
85	2783/05	13/12/2005	13/12/2006	HPP	3a	F	5	40	0	0	0	0	53	36	1,50
86	2791/05	13/12/2005	14/12/2006	HPP	8a	M	512	138	0	0	0	0	49	78	1,50
87	2792/05	13/12/2005	14/12/2006	HPP	4a	M	6	68	0	0	0	0	82	37	2,20
88	2793/05	12/12/2005	14/12/2006	HPP	2a	M	1	159	0	0	0	0	60	34	1,50
89	2799/05	13/12/2005	15/12/2006	HPP	4a	M	0	10	0	0	0	0	55	24	1,40
90	2800/05	14/12/2005	15/12/2006	HPP	6a	M	563	153	0	0	0	0	63	97	2,10
91	2801/05	13/12/2005	15/12/2006	HPP	4m	M	53	11	0	0	0	0	53	47	0,70
92	2819/05	15/12/2005	17/12/2006	HPP	3a	F	29	166	1	0	0	99	55	75	1,50
93	2820/05	14/12/2005	17/12/2006	HPP	8m	M	5	130	1	0	0	99	54	39	1,50
94	2821/05	14/12/2005	17/12/2006	HPP	7m	M	16	106	0	0	0	0	57	45	1,50
95	2830/05	12/12/2005	19/12/2006	HPP	12a	F	60	218	0	0	0	0	82	252	3,50
96	2846/05	NI	20/12/2006	HPP	20d	M	129	53	1	0	0	99	50	102	1,60

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
97	2880/05	22/12/2005	22/12/2006	HPP	2a	M	3072	14	1	0	0	99	75	29	1,00
98	2881/05	21/12/2005	22/12/2006	HPP	8a	F	0	14	1	0	0	99	70	29	1,50
99	2876/05	23/12/2005	24/12/2006	HPP	4d	M	22	49	1	0	0	99	51	194	2,40
100	2877/05	24/12/2005	24/12/2006	HPP	11a	M	5	762	1	0	0	99	90	49	2,80
101	2879/05	23/12/2005	24/12/2006	HPP	3m	M	0	14	1	0	0	99	101	33	1,80
102	2884/05	25/12/2005	26/12/2006	HPP	7a	M	106	853	0	0	0	0			2,31
103	2883/05	26/12/2005	26/12/2006	HPP	10m	F	5431	31	0	0	0	0	72	34	1,80
104	2894/05	26/12/2005	27/12/2006	HPP	4a	M	0	16	7	0	0	93	61	27	1,60
105	2895/05	25/12/2005	27/12/2006	HPP	5a	M	53	398	1	0	0	99	52	50	2,10
106	2896/05	26/12/2005	27/12/2006	HPP	7a	M	2	201	100	0	0	0	43	47	2,20
107	2898/05	NI	28/12/2006	HPP	12a	F	17	1621	0	0	0	0			2,65
108	07/06	28/12/2005	29/12/2006	HPP	8a	M	0	40	0	0	0	0	72	47	1,70
109	05/06	01/10/2006	01/01/2006	HPP	5a	M	56	13	0	0	0	0	NI	NI	1,79
110	39/06	31/12/2005	01/01/2006	HPP	4a	F	29	179	61	39	0	59	72	40	1,41
111	03/06	NI	02/01/2006	HC	7a	F	0	5	0	0	0	0	NI	NI	1,81
112	40/06	30/12/2005	02/01/2006	HPP	9a	M	0	1024	0	0	0	0			2,23
113	51/06	02/01/2006	03/01/2006	HPP	3a	M	0	101	1	0	0	99	59	25	1,30
114	52/06	31/12/2006	03/01/2006	HPP	9a	F	3	146	1	0	0	99	51	57	1,60
115	60/06	03/01/2006	04/01/2006	HPP	3m	M	2	320	1	0	0	99	39	83	1,72
116	61/06	03/01/2006	04/01/2006	HPP	5a	F	1	290	98	2	0	2	54	59	1,59
117	59/06	30/12/2005	04/01/2006	HPP	5a	M	0	10	0	0	0	0	53	24	1,30
118	70/06	04/01/2006	06/01/2006	HPP	1a	F	0	27	0	0	0	0	58	63	1,10
119	94/06	06/01/2006	07/01/2006	HPP	1a	F	1	346	0	0	0	0	91	68	2,40
120	95/06	06/01/2006	08/01/2006	HPP	1a	F	0	24	0	0	0	0	64	31	MI
121	106/06	07/01/2006	09/01/2006	HPP	8a	M	7	16	0	0	0	0	52	47	3,08
122	107/06	08/01/2006	09/01/2006	HPP	3a	M	1	170	1	0	0	99	82	54	3,18
123	108/06	02/01/2006	09/01/2006	HC	2a	M	11	42	4	0	0	96	71	38	MI
124	109/06	NI	09/01/2006	HUEC	8m	F	15	5	0	0	0	95	57	21,7	MI
125	123/06	09/01/2006	10/01/2006	HPP	6a	M	1	8	0	0	0	92	NI	NI	2,12
126	121/06	09/01/2006	10/01/2006	HPP	13a	M	341	490	26	0	0	74	61	139	MI
127	135/06	11/12/2005	11/01/2006	HC	29a	M	16	103	0	24	0	0	32	149	2,37
128	134/06	10/01/2006	11/01/2006	HPP	7a	F	2	76	0	0	0	0	50	46	2,72

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
129	138/06	08/01/2006	12/01/2006	HC	9a	F	0	23	1	4	0	95	61	29	2,27
130	163/06	12/01/2006	14/01/2006	HPP	5a	F	21,3	309	0	0	0	0	76,3	53	MI
131	164/06	14/01/2006	15/01/2006	HPP	7a	F	64	24	0	0	0	0	0	0	1,8
132	175/06	NI	16/01/2006	HPP	12a	F	1	36	1	0	0	0	61	51	2,39
133	166/06	NI	16/01/2006	HC	14a	M	42	7,2	4	0	0	96	72	29	1,90
134	174/06	16/01/2006	16/01/2006	HPP	10a	M	0	85	0	0	0	0	60	59	2,56
135	186/06	16/01/2006	17/01/2006	HPP	8a	M	0	122	0	0	0	0	0	0	1,79
136	187/06	16/01/2006	17/01/2006	HPP	10a	M	5	40	1	0	0	99	68	79	2,85
137	184/06	NI	18/01/2006	HC	2a	F	3,8	130	0	2	0	95	73	59	1,84
138	228/06	20/01/2006	20/01/2006	HPP	4a	F	38	810	1	0	0	99	69	62	2,76
139	229/06	17/01/2006	20/01/2006	HPP	5a	M	1,3	77,3	1	0	0	99	62	43	1,83
140	226/06	20/01/2006	21/01/2006	HPP	8a	M	49	31	1	0	0	99	52	40	2,23
141	230/06	21/01/2006	21/01/2006	HPP	4a	M	5	39	1	0	0	99	54	45	2,03
142	231/06	18/01/2006	21/01/2006	HC	10a	M	4	150	1	37	0	53	67	55	2,54
143	256/06	24/01/2006	25/01/2006	HPP	7a	F	10	181	1	0	0	0	58	69	3,67
144	258/06	24/01/2006	25/01/2006	HPP	6a	F	8	204	1	0	0	0	66	47	2,57
145	274/06	26/01/2006	26/01/2006	HPP	7a	M	34	73	1	0	0	0	63	30	2,66
146	275/06	25/01/2006	26/01/2006	HPP	5a	F	2986	20	0	0	0	0	74	34	1,46
147	276/06	24/01/2006	26/01/2006	HPP	8a	M	0	6	1	0	0	0	58	38	1,91
148	278/06	25/01/2006	26/01/2006	HC	3a	F	3,7	97	11	35	0	54	79	12,6	1,42
149	300/06	NI	27/01/2006	HPP	6a	M	0	48	1	0	0	99	57	41	2,75
150	301/06	28/01/2006	29/01/2006	HPP	2a	M	1	215	0	0	0	0	59	81	1,84
151	302/06	NI	29/01/2006	HPP	6a	F	2	384	0	0	0	0	59	81	2,40
152	309/06	25/01/2006	30/01/2006	HPP	11a	M	173	16	1	0	0	99	61	33	1,89
153	323/06	30/01/2006	31/01/2006	HPP	3a	M	1	186	1	0	0	99	67	54	1,83
154	364/06	21/01/2006	03/02/2006	HPP	3a	M	426	1642,6	1	0	0	99	55	151	2,84
155	393/06	03/02/2006	03/02/2006	HPP	3a	F	218,6	20,6	1	0	0	99	59,3	126	1,91
156	367/06	04/02/2006	05/02/2006	HPP	7a	M	6400	100	0	0	0	0	113	104	1,73
157	368/06	02/02/2006	05/02/2006	HPP	1a	M	0	100	0	0	0	0	75	42	1,69
158	369/06	03/02/2006	05/02/2006	HPP	10m	F	29354,6	136	0	0	0	0	72	86	1,46
159	370/06	03/02/2006	05/02/2006	HPP	6m	F	2389	224	1	0	0	99	51	85	1,60
160	400/06	07/02/2006	08/02/2006	HPP	9a	M	145	13	1	0	0	99	70	34	1,93

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
161	401/06	07/02/2006	08/02/2006	HPP	12a	M	1	18,6	1	0	0	99	55	103	2,88
162	402/01	07/02/2006	08/02/2006	HPP	11a	M	0	64	1	0	0	99	69	65	2,86
163	436/06	08/02/2006	10/02/2006	HPP	4a	M	5	80	1	0	0	99	102	31	1,58
164	437/06	08/02/2006	10/02/2006	HPP	7a	M	1	224	1	0	0	99	70	56	2,02
165	441/06	08/02/2006	11/02/2006	HPP	4a	F	18	1429	92	8	0	0	83	79	2,81
166	458/06	NI	13/02/2006	HPP	2a	M	10	154	0	0	0	0	NI	NI	2,61
167	483/06	14/02/2006	15/02/2006	HPP	7a	M	1	154	1	0	0	99	57	53	1,66
168	485/06	15/02/2006	16/02/2006	HPP	2a	M	512	330	0	0	0	0	62	49	2,66
169	486/06	12/02/2006	16/02/2006	HPP	12a	M	21	1194	1	0	0	99	59	98	1,83
170	501/06	17/02/2006	17/02/2006	HPP	3a	F	1	9	0	0	0	0			2,27
171	500/06	15/02/2006	20/02/2006	HPP	11a	F	2	11	5	0	0	95	65	75	2,02
172	509/02	19/02/2006	20/02/2006	HPP	12a	F	3	10	1	0	0	99	54	52	1,58
173	520/06	19/02/2006	20/02/2006	HC	4a	F	6400	62	0	45	0	55	66	20	1,66
174	530/06	19/02/2006	21/02/2006	HPP	8a	M	0	16	0	0	0	0	60	48	1,87
175	522/06	16/02/2006	21/02/2006	HC	7a3m	M	25	285	2	5	0	93	67	36,9	2,31
176	531/06	21/02/2006	22/02/2006	HPP	7m	F	1301	14	1	0	0	0	54	49	1,57
177	540/06	NI	23/02/2006	HC	11a	M	0,6	98	0	39	0	60	78	43	1,82
178	556/06	23/02/2006	23/02/2006	HC	9a3m	F	7,2	51	3	1	0	96	59	49	2,39
179	558/06	22/02/2006	23/02/2006	HC	2a10m	F	25	70	11	31	0	58	53	22,3	2,29
180	564/06	23/02/2006	24/02/2006	HPP	1a	M	3	57	0	0	0	0	73	40	1,98
181	565/06	NI	24/02/2006	HC	9a	M	1,9	6,3	0	28	0	70	61	20	2,27
182	589/06	26/02/2006	26/02/2006	HC	11m11d	M	1190	48	91	9	0	0	55	26	2,24
183	616/06	23/02/2006	24/02/2006	HPP	7m	M	3,3	30	1	0	0	99	82	46	2,12
184	621/06	23/02/2005	24/02/2006	HPP	4a	M	1,6	202	1	0	0	99	66	76	2,25
185	622/06	23/02/2006	24/02/2006	HPP	11a	M	125	21	1	0	0	99	61	58	1,99
186	618/06	24/02/2006	25/02/2006	HPP	6a	M	2,3	86,6	1	0	0	99	58	38	2,26
187	619/06	24/02/2006	25/02/2006	HPP	3a	F	84,3	984	1	0	0	99	51	61	MI
188	620/06	24/02/2006	25/02/2006	HPP	4a	F	1	37,3	1	0	0	99	51	66	1,89
189	598/06	25/02/2006	26/02/2006	HPP	5a	M	15	14	0	0	0	0	78	33	1,98
190	615/06	25/02/2006	26/02/2006	HPP	9a	F	7,6	426	1	0	0	99	85	78	3,00
191	617/06	24/02/2006	26/02/2006	HPP	9a	M	40	60	1	0	0	99	61	47	1,95
192	614/06	01/03/2006	02/03/2006	HPP	7a	F	1	76	0	0	0	0	NI	NI	2,00

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
193	610/06	02/03/2006	02/03/2006	HPP	6a	M	1	27	1	0	0	99	87	83	2,07
194	611/06	26/02/2006	02/03/2006	HPP	3a	M	6	79	0	0	0	0	63	61	2,22
195	613/06	01/03/2006	02/03/2006	HPP	5a	M	1	181	1	0	0	99	82	43	2,36
196	632/06	02/03/2006	03/03/2006	HPP	3a	M	26	149	1	0	0	99	74	31	1,28
197	633/06	28/02/2006	06/03/2006	HPP	9a	M	6826	661	0	0	0	0	83	178	1,98
198	676/06	03/03/2006	06/03/2006	HPP	5a	M	682	181	1	0	0	99	53	8	2,22
199	677/06	05/03/2006	06/03/2006	HPP	13a	F	2	17	1	0	0	99	68	47	2,31
200	679/06	05/03/2006	06/03/2006	HPP	5a	M	3	12	1	0	0	99	79	35	1,72
201	683/06	06/03/2006	06/03/2006	HPP	5a	M	1	512	1	0	0	99	67	69	2,07
202	685/06	04/03/2006	08/03/2006	HPP	3a	F	330	10	1	0	0	99	62	30	1,66
203	689/06	08/03/2006	08/03/2006	HC	11a6m	M	10	350	6	28	0	66	76	51	2,34
204	699/06	07/03/2006	09/03/2006	HPP	11a	F	6	726	1	0	0	99	NI	NI	2,06
205	701/06	08/03/2006	09/03/2006	HPP	5a	M	21	288	0	0	0	0	59	85	2,26
206	702/06	07/03/2006	09/03/2006	HPP	3a	M	1	112	1	0	0	99	67	51	2,66
207	703/06	09/03/2006	09/03/2006	HC	4a	M	3	16,2	4	8	0	88	93	25,8	2,62
208	704/06	09/03/2006	10/03/2006	HC	4a8m	M	1	19	0	19	0	81	60	23	1,80
209	717/06	09/03/2006	10/03/2006	HPP	4a	M	1	11	1	0	0	99	62	28	1,82
210	719/06	08/03/2006	11/03/2006	HPP	11a	M	4	469	1	0	0	99	56	166	2,41
211	720/06	10/03/2006	11/03/2006	HPP	11a	M	0,3	48	1	0	0	99	60	34	1,80
212	721/06	08/03/2006	11/03/2006	HPP	11a	F	13	64	1	0	0	99	53	61	2,06
213	722/06	09/03/2006	11/03/2006	HPP	6a	F	2	80	1	0	0	99	54	40	2,11
214	735/06	12/03/2006	13/03/2006	HPP	3a	M	1	21	0	0	0	0	NI	NI	2,04
215	725/06	12/03/2006	13/03/2006	HC	8a11m	M	6,3	12,8	3	0	68	29	66	31,5	1,91
216	734/06	12/03/2006	13/03/2006	HPP	7a	F	2	405	96	4	0	0	57	84	2,24
217	738/06	11/03/2006	13/03/2006	HPP	4a	M	896	76	0	0	0	0	75	48	1,92
218	747/06	13/03/2006	14/03/2006	HPP	6a	M	1	96	1	0	0	99	66	29	1,61
219	756/06	13/03/2006	15/03/2006	HPP	7a	F	77	50	1	0	0	99	65	29	MI
220	757/06	15/03/2006	15/03/2006	HPP	3a	M	0	15	0	0	0	0	NI	NI	1,70
221	767/06	15/03/2006	16/03/2006	HPP	6a	F	2	8	1	0	0	99	67	27	1,38
222	768/06	14/03/2006	16/03/2006	HPP	5a	M	56	119	1	0	0	99	51	69	1,80
223	769/06	12/03/2006	16/03/2006	HC	12a5m	M	3	332	0	7	0	93	60	56,1	3,22
224	795/06	17/03/2006	17/03/2006	HPP	3a	M	22613	40	1	0	0	99	61	40	1,64

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
225	793/06	15/03/2006	18/03/2006	HPP	9a	M	8	86	1	0	0	99	67	38	2,15
226	796/06	18/03/2006	19/03/2006	HPP	6a	F	0	30	1	0	0	99	64	37	2,53
227	800/06	18/03/2006	20/03/2006	HC	7a	M	0	84	0	7	0	93	75	20	MI
228	808/06	19/03/2006	20/03/2006	HPP	6a	F	12	58	0	0	0	0			2,37
229	794/06	19/03/2006	20/03/2006	HPP	3a	F	6	352	0	0	0	0	61	57	1,86
230	799/06	NI	20/03/2006	HC	5	M	1,8	488	2	44	0	54	78	36	MI
231	810/06	NI	21/03/2006	HPP	1a	M	0	173	0	0	0	0	NI	NI	1,78
232	820/06	21/03/2006	22/03/2006	HC	7a	M	10	188	0	36	0	64	59	49	2,47
233	828/06	22/03/2006	22/03/2006	HPP	7a	M	1	60	1	0	0	99	79	32	2,13
234	826/06	NI	22/03/2006	HPP	2a	F	0	12	1	0	0	99	72	21	1,63
235	829/06	22/03/2006	22/03/2006	HPP	1a	F	2432	13	1	0	0	99	68	20	1,66
236	827/06	20/03/2006	23/03/2006	HPP	11a	M	2	78	0	0	0	0	55	64	1,69
237	839/06	21/03/2006	23/03/2006	HPP	13a	M	1	238	0	0	0	0	63	48	2,30
238	840/06	22/03/2006	23/03/2006	HPP	6a	F	1	204	1	0	0	99	58	34	1,91
239	841/06	22/03/2006	23/03/2006	HPP	5a	M	2	80	1	0	0	99	54	40	1,92
240	866/06	24/03/2006	24/03/2006	HPP	5a	F	0,6	11,3	1	0	0	99	63	28	2,4
241	865/06	19/03/2006	24/03/2006	HPP	5a	F	51,3	11,6	1	0	0	99	60	27	1,84
242	860/06	25/03/2006	26/03/2006	HPP	3a	F	1	75	0	0	0	0	80	21	1,81
243	861/06	25/03/2006	26/03/2006	HPP	2a	M	6	120	0	0	0	0	63	30	1,96
244	868/06	25/03/2006	26/03/2006	HPP	14a	M	13	512	0	0	0	0	52	41	1,89
245	870/06	26/03/2006	27/03/2006	HC	25a	M	120	24	0	5	0	95	63	64	1,71
246	884/06	25/03/2006	27/03/2006	HC	6a	F	1	7	52	48	0	0	63	18,4	2,04
247	885/06	26/03/2006	27/03/2006	HPP	9a	F	0	58	0	0	0	0	79	25	2,10
248	896/06	23/03/2006	28/03/2006	HPP	4a	F	0	13	1	0	0	99	61	22	2,37
249	897/06	27/03/2006	28/03/2006	HPP	8a	F	10	112	0	0	0	0	75	40	2,5
250	895/06	28/03/2006	28/03/2006	HPP	10a	M	2	86	0	0	0	0	75	40	2,18
251	898/06	27/03/2006	28/03/2006	HPP	8m	M	1	14	1	0	0	99	74	27	1,76
252	899/06	28/03/2006	28/03/2006	HPP	4a	M	4	134	0	0	0	0	62	43	2,39
253	900/06	NI	29/03/2006	HC	1a9m	F	70	55	0	1	0	96	60	46,1	1,61
254	901/06	28/03/2006	29/03/2006	HPP	4a	F	73	8	1	0	0	99	56	39	2,08
255	902/06	27/03/2006	29/03/2006	HPP	6a	F	53	624	0	0	0	0	56	133	3,32
256	903/06	27/03/2006	30/03/2006	HPP	8a	M	0	85	0	0	0	0	64	53	1,81

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
257	904/06	27/03/2006	30/03/2006	HPP	9a	F	1	6	0	0	0	0	63	43	1,65
258	905/06	28/03/2006	30/03/2006	HPP	7a	M	2	28	0	0	0	0	66	52	2,11
259	914/06	NI	30/03/2006	HC	10a	M	3,2	115	6	42	0	52	60	48,2	1,75
260	932/06	30/03/2006	30/03/2006	HPP	3a	M	1	59	0	0	0	0	62	52	2,04
261	933/06	30/03/2006	30/03/2006	HPP	2a	M	5	157	0	0	0	0	61	40	1,79
262	935/06	29/03/2006	30/03/2006	HPP	6a	F	4	16	1	0	0	99	59	30	1,55
263	936/06	30/03/2006	30/03/2006	HC	3a1m	F	40	300	4	0	0	92	55	31	2,38
264	957/06	29/03/2006	31/03/2006	HPP	10a	M	10	267	1	0	0	99	60	72	2,25
265	958/06	30/03/2006	31/03/2006	HPP	12a	M	0	24	1	0	0	99	68	24	MI
266	959/06	28/03/2006	31/03/2006	HPP	5a	F	1	98	0	0	0	0	59,4	70	MI
267	953/06	01/04/2006	02/04/2006	HPP	2a	M	202	266	0	0	0	0	69	44	2,18
268	954/06	01/04/2006	02/04/2006	HPP	8a	M	0	22	0	0	0	0	73	47	3,25
269	955/06	02/04/2006	02/04/2006	HPP	4a	M	186	39	0	0	0	0	66	46	2,07
270	956/06	01/04/2006	02/04/2006	HPP	8a	M	37	117	0	0	0	0	73	39	1,50
271	961/06	02/04/2006	03/04/2006	HC	7a8m	F	20	21,2	5	47	0	48	61	34	2,25
272	970/06	03/04/2006	03/04/2006	HPP	8a	M	6	341	0	0	0	0	71	39	1,90
273	971/06	03/04/2006	03/04/2006	HPP	6a	F	2	53	0	0	0	0	71	37	2,32
274	972/06	02/04/2006	04/04/2006	HC	4a4m	F	8,8	490	7	8	0	13	56	49	2,53
275	987/06	01/04/2006	04/04/2006	HPP	5a	M	6869	24	1	0	0	99	51	35	1,93
276	994/06	31/03/2006	05/04/2006	HPP	4a	M	0	14	0	0	0	0	50	57	1,73
277	995/06	05/04/2006	05/04/2006	HPP	3a	M	2	10	0	0	0	0	63	35	2,05
278	1008/06	02/04/2006	07/04/2006	HC	12a	M	15	32	0	0	0	0	51	39	2,14
279	1019/06	25/03/2006	07/04/2006	HPP	4a	M	0,6	31	1	0	0	99	97	39	2,26
280	1024/06	05/04/2006	07/04/2006	HPP	3a	F	3956	80	1	0	0	99	55	49	2,15
281	1020/06	06/04/2006	08/04/2006	HPP	1a	M	0,3	170,6	1	0	0	99	58	38	2,40
282	1021/06	07/04/2006	08/04/2006	HPP	3a	M	10,6	41,6	0	0	0	0	81	28	2,54
283	1025/06	08/04/2006	10/04/2006	HC	11a	M	2	54	1	5	0	85	58	59	2,45
284	1038/06	07/04/2006	10/04/2006	HPP	5a	F	409	22	1	0	0	99	59	50	1,74
285	1057/06	09/04/2006	11/04/2006	HPP	6a	F	8	32	1	0	0	99	55	44	2,23
286	1058/06	10/04/2006	11/04/2006	HPP	8a	F	187	392	1	0	0	99	52	45	2,13
287	1092/06	07/04/2006	12/04/2006	HPP	7a	M	1	114	1	0	0	99	59	50	2,27
288	1093/06	10/02/2006	12/04/2006	HPP	14a	M	232	384	1	0	0	99	725	80	2,20

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
289	1064/06	NI	13/04/2006	HC	6a5m	F	202	11,6	9	0	0	91	63	29,1	2,61
290	1083/06	12/04/2006	13/04/2006	HPP	5a	M	6,6	273,3	1	0	0	0	59,3	55	2,29
291	1086/06	14/04/2006	15/04/2006	HPP	4a	F	0,6	266,6	0	0	0	0	74,8	62	2,37
292	1089/06	15/04/2006	16/04/2006	HPP	7a	M	0	38	0	0	0	0	68	44	2,41
293	1133/06	19/04/2006	19/04/2006	HPP	7a	M	6	9	1	0	0	0	71	37	1,42
294	1134/06	19/04/2006	19/04/2006	HPP	5a	M	3037	102	98	2	0	0	61	56	2,20
295	1153/06	19/04/2006	20/04/2006	HPP	6a	F	36	192	1	0	0	0	52	44	2,09
296	1155/06	17/04/2006	20/04/2006	HPP	2a	F	1	26	1	0	0	0	50	19	1,72
297	1156/06	19/04/2006	21/04/2006	HPP	1a	M	7454	5	1	0	0	0	65	50	1,73
298	1160/06	21/04/2006	21/04/2006	HPP	4a	M	0,6	16	1	0	0	0	58	29	1,41
299	1152/06	20/04/2006	22/04/2006	HPP	17a	M	1	96	1	0	0	0	60	40	1,81
300	1154/06	22/04/2006	23/04/2006	HPP	3a	F	766	192	1005	0	0	0	64	27	2,28
301	1161/06	22/04/2006	23/04/2006	HPP	4a	M	3493	114	1	0	0	0	88	28	MI
302	1173/06	18/04/2006	24/04/2006	HPP	2a	M	1	160	1	0	0	0	50	24	2,18
303	1188/06	23/04/2006	25/04/2006	HPP	6a	F	48	80	0	0	0	0	58	62	2,36
304	1189/06	25/04/2006	25/04/2006	HPP	2a	F	2	660	0	0	0	0	51	74	1,89
305	1190/06	24/04/2006	25/04/2006	HPP	5a	F	16	170	0	0	0	0	51	64	2,07
306	1191/06	25/04/2006	25/04/2006	HPP	5a	F	37	386	0	0	0	0	58	48	2,37
307	1196/06	26/04/2006	26/04/2006	HPP	9a	M	1	63	1	0	0	0	60	32	1,87
308	1197/06	24/04/2006	26/04/2006	HPP	3a	F	1280	55	0	0	0	0	76	51	1,96
309	1198/06	26/04/2006	26/04/2006	HPP	5a	M	16	928	0	0	0	0	57	45	2,67
310	1199/06	24/04/2006	26/04/2006	HPP	7a	M	0	30	1	0	0	0	60	21	1,88
311	1216/06	24/04/2006	27/04/2006	HPP	9a	M	238	119	1	0	0	0	58	40	2,21
312	1217/06	25/04/2006	27/04/2006	HPP	4a	F	2	34	0	0	0	0	63	27	1,87
313	1218/06	20/04/2006	27/04/2006	HPP	5a	F	0	49	1	0	0	0	70	28	2,58
314	1228/06	28/04/2006	28/04/2006	HPP	12a	M	1	63	0	0	0	0	65	38	2,21
315	1251/06	26/04/2006	28/04/2006	HC	8a	M	10	15	3	1	0	87	59	31	2,04
316	1250/06	27/04/2006	30/04/2006	HC	2a	F	6400	300	2	8	0	90	57	78	2,31
317	1298/06	05/05/2006	06/05/2006	HPP	4m	F	2,6	31,6	1	0	0	0	77	37	1,64
318	1315/06	07/05/2006	08/05/2006	HPP	1m	F	1	50	1	0	0	0	53	64	2,75
319	1343/06	08/05/2006	10/05/2006	HPP	8a	F	0	96	1	0	0	0	61	63	2,85
320	1353/06	10/05/2006	11/05/2006	HC	6a	M	1,3	109	19	14	0	67	53	30	2,28

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
321	1513/06	NI	11/05/2006	HC	4	M	1,3	109	19	14	0	67	53	30	MI
322	1388/06	11/05/2006	15/05/2006	HPP	3a	M	0	90	100	0	0	0	74	33	2,14
323	1389/06	01/05/2006	15/05/2006	HPP	2a	F	2645	22	0	0	0	0	52	99	1,82
324	1399/06	15/05/2006	16/05/2006	HPP	7a	F	3	176	0	0	0	0	64	42	1,69
325	1400/06	15/05/2006	16/05/2006	HPP	4a	M	2	304	98	2	0	0	65	33	2,49
326	1462/06	19/05/2006	20/05/2006	HC	12a	F	3	11	37	0	0	63	60	0	1,46
327	1457/06	20/05/2006	21/05/2006	HPP	6a	F	0	37	1	0	0	99	66	37	2,29
328	1459/06	21/05/2006	21/05/2006	HPP	2a	M	6	548	0	0	0	0	67	44	2,49
329	1492/06	22/05/2006	24/05/2006	HPP	5a	M	458	170	1	0	0	99	80	30	1,66
330	1521/06	25/05/2006	26/05/2006	HPP	6a	M	1	101	1	0	0	99	61	42	1,85
331	1524/06	23/05/2006	26/05/2006	HPP	1a	F	13	44	0	0	0	0	53	37	2,13
332	1522/06	23/05/2006	27/05/2006	HPP	5a	F	768	192	0	0	0	0	91	31	2,50
333	1602/06	02/06/2006	02/06/2006	HPP	6a	M	93	81	1	0	0	99	61	49	2,33
334	1604/06	02/06/2006	02/06/2006	HPP	3a	M	35157	133	1	0	0	99	61	78	1,84
335	1603/06	28/05/2006	03/06/2006	HPP	2a	F	2	122	1	0	0	99	63	47	2,03
336	1606/06	25/05/2006	04/06/2006	HPP	3a	M	0	34	0	0	0	0	68	31	1,57
337	1623/06	03/06/2006	05/06/2006	HPP	8a	M	8	176	1	0	0	99	73	46	2,11
338	1655/06	07/06/2006	07/06/2006	HPP	4a	F	2986	53	0	0	0	0	57	51	MI
339	1656/06	07/06/2006	07/06/2006	HPP	3a	M	3	74	0	0	0	0	63	22	2,48
340	1657/06	06/06/2006	07/06/2006	HPP	5a	F	1	143	0	0	0	0	63	37	2,43
341	1702/06	06/06/2006	10/06/2006	HPP	6a	F	5,3	122	1	0	0	99	60	41	2,52
342	1740/06	09/06/2006	13/06/2006	HPP	6a	M	3	19	1	0	0	99	62	30	2,74
343	1766/06	13/06/2006	15/06/2006	HPP	3a	M	2	93	1	0	0	99	51	39	MI
344	1770/06	11/06/2006	16/06/2006	HPP	8a	M	0	14	0	0	0	0		28	MI
345	1769/06	16/06/2006	18/06/2006	HPP	6a	M	0	54	0	0	0	0	59	54	2,00
346	1780/06	18/06/2006	19/06/2006	HPP	7a	M	1	170	1	0	0	99	55	36	MI
347	1781/06	19/06/2006	19/06/2006	HPP	7a	M	1	69	0	0	0	0	84	39	2,61
348	1782/06	18/06/2006	19/06/2006	HPP	6a	F	2048	12	0	0	0	0	67	23	1,15
349	1811/06	21/06/2006	21/06/2006	HPP	3a	F	12	133	1	0	0	99	65	36	MI
350	1812/06	20/06/2006	21/06/2006	HPP	12a	M	0	277	0	0	0	0	62	56	2,15
351	1846/06	22/06/2006	23/06/2006	HPP	15a	F	204	358	1	0	0	99	58	90	2,10
352	1876/06	26/06/2006	26/06/2006	HPP	2a	F	13	138	1	0	0	99	51	40	2,02

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
353	1878/06	25/06/2006	26/06/2006	HPP	3a	F	2	204	1	0	0	99	50	24	1.73
354	1879/06	26/06/2006	26/06/2006	HPP	11a	F	1	324	1	0	0	99	59	93	1.48
355	1874/06	26/06/2006	27/06/2006	HPP	5a	M	1	49	0	0	0	0	75	21	MI
356	1875/06	27/06/2006	27/06/2006	HPP	7a	M	0	23	1	0	0	99	71	40	2.60
357	1891/06	24/06/2006	28/06/2006	HPP	9a	M	0	14	0	0	0	0	57	25	1.81
358	1910/06	25/06/2006	29/06/2006	HPP	10a	F	1	144	1	0	0	99	55	45	1.79
359	1935/06	NI	01/07/2006	HC	5	M	2	2640	0	0	0	0	63	62	MI
360	1969/06	01/07/2006	05/07/2006	HC	7a6m	F		56	0	0	0	100	64	15	1.88
361	2072/06	16/07/2006	17/07/2006	HC	3a	F	14	373	0	5	0	95	54	47	MI
362	2147/06	23/07/2006	24/07/2006	HC	5a	M	3	136	1	7	0	92	64	23	2.31
363	2172/06	26/07/2006	26/07/2006	HC	4a	F	19	45	0	8	0	92	59	48	1.61
364	2429/06	16/08/2006	18/08/2006	HC	5a	M	170	80	0	15	0	85	73	27,1	2.31
365	2474/06	19/08/2006	21/08/2006	HC	8a	M	500	34	2	38	0	6	69	51	MI
366	2483/06	18/08/2006	24/08/2006	HC	13a	F	0,9	150	15	6	0	25	59	53,5	2.49
367	2515/06	26/08/2006	28/08/2006	HC	5a	F	2	50	3	9	0	88	72	17,2	MI
368	2535/06	27/08/2006	30/08/2006	HC	6a	F	2	62	0	31	0	69	62	23,7	MI
369	2559/06	27/08/2006	01/09/2006	HC	9a	F	5	226	9	12	0	78	63	53	1,67
370	2574/06	31/08/2006	02/09/2006	HC	5a	F	1440	835	4	1	0	95	65	45	2,55
371	2598/06	31/08/2006	02/09/2006	HC	19a	F	9	134	1	35	0	55	53	82	1.16
372	2599/06	01/09/2006	04/09/2006	HC	15a	M	6,2	42	0	8	0	92	73	32	1.17
373	2625/06	05/09/2006	07/09/2006	HC	7a	M	40	70	1	7	0	92	78	54	2.30
374	2684/06	08/09/2006	14/09/2006	HC	1a	M	47	8,1	9	7	0	81	80	57	1.82
375	2750/06	11/09/2006	17/09/2006	HC	13a	M	25	306	75	25	0	0	54	103	1,41
376	2723/06	16/09/2006	18/09/2006	HC	12a	M	10	105	0	16	0	84	72	62,5	2,98
377	2751/06	18/09/2006	21/09/2006	HC	4a	F	1,3	216	11	24	0	64	50	29	2,43
378	2780/06	23/09/2006	24/09/2006	HC	8a	F	2	21	87	13	0	0	60	35	1,97
379	2804/06	25/09/2006	26/09/2006	HC	5a	M	1,5	518	2	21	0	77	64	64	2,81
380	2813/06	26/09/2006	27/09/2006	HC	4a	M	3	900	3	4	0	93	80	27	2,35
381	2823/06	28/09/2006	29/09/2006	HC	4a	M	2	258	3	0	0	97	62	42,8	2,46
382	2824/07	28/09/2006	30/09/2006	HC	5a	M	0,3	161	2	9	0	89	87	38	2,87
383	2825/06	26/09/2006	02/10/2006	HC	42a	F	44	21	1	17	0	8	59	41	1,17
384	2859/06	02/10/2006	03/10/2006	HC	4a	M	0	35	2	47	0	41	70	27,6	1,97

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
385	2892/06	03/10/2006	05/10/2006	HC	6a	M	1,6	104	10	2	0	78	70	44	3,00
386	2904/06	04/10/2006	06/10/2006	HC	7a	M	17	131	0	3	0	97	58	55	2,22
387	2915/06	04/10/2006	06/10/2006	HC	5a	M	29	210	0	5	0	95	72	39,1	3,00
388	2938/06	05/10/2006	06/10/2006	HC	14a	F	33	157	11	21	0	68	68	56,1	1,86
389	2940/06	07/10/2006	07/10/2006	HC	20a	M	21	94	0	46	0	54	63	62,5	2,60
390	2984/06	06/10/2006	07/10/2006	HC	32a	F	0,3	58,1	1	11	0	88	69	48,5	MI
391	2918/06	03/10/2006	09/10/2006	HC	78a	F	0,3	18	7	4	0	89	56	56	2,01
392	2919/06	06/10/2006	09/10/2006	HC	16a	F	0,3	36	0	2	0	98	59	31,2	3,00
393	2921/06	03/10/2006	09/10/2006	HC	10a	M	9,6	142	11	0	0	89	62	45	2,15
394	2974/06	08/10/2006	10/10/2006	HC	5a	M	6	250	12	3	0	58	59	43	2,41
395	3014/06	11/10/2006	14/10/2006	HC	41a	M	2560	1440	24	26	0	50	64	115	2,30
396	2986/06	14/10/2006	15/10/2006	HC	6a	F	340	11	0	43	0	57	68	30	3,00
397	2988/06	14/10/2006	15/10/2006	HC	5a	M	10	57	1	9	0	90	69	43	3,04
398	2987/06	13/10/2006	16/10/2006	HC	4a	M	5440	35	6	38	0	56	62	23	1,59
399	3110/06	24/10/2006	25/10/2006	HC	3m	F	1,3	304	9	37	0	54	58	46	2,5
400	3114/06	NI	25/10/2006	HC	7	M	58	6	3	0	0	97	59	111	2,00
401	3115/06	26/10/2006	26/10/2006	HC	19a	F	15	100	3	0	0	94	52	68	1,6
402	3125/06	25/10/2006	26/10/2006	HC	9a	M	450	80	2	23	0	75	61	66	1,90
403	3133/06	26/10/2006	27/10/2006	HC	6a	M	2	51	1	11	0	88	63	35	3,85
404	3136/06	24/10/2006	27/10/2006	HC	8m	M	6	200	15	7	0	78	67	19,1	1,96
405	3185/06	31/10/2006	31/10/2006	HC	6a	F	3	11,6	17	0	0	83	71	19,4	2,30
406	3186/06	31/10/2006	31/10/2006	HC	7a	M	2,6	8,3	0	49	0	51	90	33	2,09
407	3193/06	29/10/2006	01/11/2006	HC	13a	F	178	410	3	1	0	96	53	69	1,70
408	3198/06	01/11/2006	02/11/2006	HC	11a	M	9,3	19	0	35	0	65	62	N	2,40
409	3199/06	29/10/2006	03/11/2006	HC	11a	M	3	80	25	1	0	65	64	44,5	1,90
410	3214/06	03/11/2006	06/11/2006	HC	6a	M	2,2	103	1	23	0	76	59	38	1,3
411	3212/06	05/11/2006	06/11/2006	HC	10a	F	9	274	2	37	0	61	55	102	2,50
412	3213/06	05/11/2006	06/11/2006	HC	8a	F	1	18	0	0	0	1	57	22	2,11
413	3240/06	08/11/2006	08/11/2006	HC	7a	M	1	14,3	0	42	0	57	55	20,9	1,89
414	3267/06	NI	10/11/2006	HC	5a8m	M	8	150	15	3	0	55	74	25,2	1,90
415	3293/06	13/11/2006	14/11/2006	HC	4a	M	0	31	5	42	0	53	67	26	2,0
416	3296/06	12/11/2006	15/11/2006	HC	7a	F	7	53	2	23	0	57	67	28	2,09

Nº	Reg	1º Sint	Col	Local	Idade	Sexo	Hem/mm ³	Leuc/mm3	Mn%	Neut%	Eos%	Linf%	Glic	Pt	Al mmol/L
417	3295/06	14/11/2006	16/11/2006	HC	9a	M	10	215	0	1	0	90	74	44,7	MI
418	3303/06	13/11/2006	16/11/2006	HC	7a	M	18	20	0	15	0	85	75	43	2,03
419	3304/06	15/11/2006	16/11/2006	HC	23a	F	0	95	1	8	0	91	63	97	2,40
420	3305/06	13/11/2006	16/11/2006	HC	6a	M	0	245	1	21	0	78	67	35	2,00
421	3348/06	19/12/2006	22/11/2006	HC	7m	M	8160	65	5	35	0	40	87	45	MI
422	3372/06	23/11/2006	24/11/2006	HC	6a	F	3	40	15	2	0	83	56	37,8	2,30
423	3388/06	26/11/2006	26/11/2006	HC	9a	F	3,1	98	0	6	0	94	67	26,1	2,4
424	3407/06	26/11/2006	28/11/2006	HC	6a	F	3,4	29	6	2	0	92	66	27	2,20
425	3409/06	29/11/2006	29/11/2006	HC	5a	F	0,9	20	25	15	0	60	61	17	2,3
426	3427/06	27/11/2006	01/12/2006	HC	21a	F	3	210	1	15	0	75	68	55,7	2,70
427	3430/06	30/11/2006	02/12/2006	HC	8a	M	17,5	88,7	6	5	0	88	86	47,2	2,40
428	3429/06	01/12/2006	03/12/2006	HC	2a	M	10	300	8	32	0	60	68	41,6	2,2
429	3428/06	01/12/2006	05/12/2006	HC	5a	F	3	250	5	4	0	55	79	34	2,00
430	3443/06	04/12/2006	05/12/2007	HC	5a	M	465	16,8	9	44	0	47	59	33	2,35
431	3463/06	05/12/2006	06/12/2006	HC	6a	M	6,3	86	17	0	0	83	60	30	2,70
432	3478/06	02/12/2006	07/12/2006	HC	18a	F	7,5	111	12	0	0	87	57	32	2,30
433	3482/06	08/12/2006	08/12/2006	HC	13a	M	2,5	85	0	10	0	90	73		2,42
434	3485/06	08/12/2006	09/12/2006	HC	7a	F	6	120	5	10	0	85	56	25	2,61
435	3486/06	09/12/2006	10/12/2006	HC	2a	M	3	80	0	45	0	55	64	32	2,40
436	3522/06	12/12/2006	12/12/2006	HC	5a	F	150	40	6	4	0	91	87	20	2,34
437	3523/06	13/12/2006	13/12/2006	HC	5a	F	5	21	0	29	0	71	77		3,10
438	3528/06	13/12/2006	14/12/2006	HC	9a	F	160	275	0	23	0	77	59	70	2,70
439	3551/06	NI	16/12/2006	HC	7a	F	295	15	4	13	0	83	81	29	2,20
440	3552/06	NI	16/12/2006	HC	8a	F	55	135	4	12	0	84	69	41	3,00

Legenda: Reg= identificação da amostra; 1ºSint= data dos primeiros sintomas; Col= data da coleta da amostra; Hem=hemácias;
Leuc= Leucócitos; Mn= monócitos; Neut= neutrófilos; Eos= eosinófilos

—
—
—

APÊNDICE 3
TABELA DOS DADOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

	Reg.	Col.	Hos	ID	Sex	PCR	T.Real PCR	Log	Tipo EV	Estação	Escore
1	1252/05	20-jul	HUEC	1a	F	NEG	0	0		Inverno	1
2	1249/05	21-jul	HUEC	7m	M	NEG	0	0		Inverno	2
3	1250/05	27-jul	HUEC	85a	F	NEG	0	0		Inverno	1
4	1251/05	27-jul	HUEC	1a	M	NEG				Inverno	1
5	1292/05	12-ago	HC	1a5m	M	NEG				Inverno	1
6	1310/05	15-ago	HUEC	5m	M	ENT	62,5	1,8		Inverno	1
7	1309/05	15-ago	HUEC	31a	M	NEG	0	0		Inverno	2
8	1363/05	25-ago	HUEC	0	M	ENT	125	2,1		Inverno	1
9	1462/05	12-set	HUEC	0	F	ENT	MI	MI		Inverno	2
10	1540/05	23-set	HC	32a	F	NEG	0	0		Primavera	1
11	1591/05	26-set	HUEC	7a	F	NEG				Primavera	2
12	1592/05	30-set	HUEC	1a	F	NEG				Primavera	0
13	1723/05	24-out	HUEC	1a	M	NEG				Primavera	0
14	1770/05	31-out	HUEC	1a	F	NEG	64937,5	4,8		Primavera	0
15	1804/05	2-nov	HPP	3a	F	NEG	0	0		Primavera	1
16	1788/05	3-nov	HUEC	14a	M	NEG	0	0		Primavera	0
17	1805/05	3-nov	HPP	9m	M	NEG	0	0		Primavera	0
18	1806/05	3-nov	HPP	2a	F	NEG	51000	4,7		Primavera	0
19	1807/05	3-nov	HPP	3a	M	NEG				Primavera	0
20	1808/05	3-nov	HPP	8m	F	NEG				Primavera	0
21	1826/05	4-nov	HPP	4a	M	NEG	4687,5	3,67		Primavera	2
22	1827/05	4-nov	HPP	5m	M	NEG	0	0		Primavera	0
23	1828/05	5-nov	HPP	3m	M	NEG	11187,5	4,048		Primavera	0
24	1829/05	5-nov	HPP	5m	F	NEG	100375	5		Primavera	0
25	1830/05	5-nov	HPP	5a	M	NEG	0	0		Primavera	0
26	1834/05	5-nov	HC	1a	M	NEG	0	0		Primavera	1
27	1831/05	6-nov	HPP	6a	M	NEG	3268,75	3,51		Primavera	0
28	1832/05	6-nov	HPP	6a	M	NEG	4931,25	3,69		Primavera	0
29	1835/05	7-nov	HUEC	8a	F	NEG	4005	3,6		Primavera	0
30	1836/05	7-nov	HUEC	9m	M	NEG	0	0		Primavera	0
31	1837/05	7-nov	HUEC	2a	M	NEG	0	0		Primavera	0
32	1853/05	7-nov	HPP	12a	M	NEG	19026,25	4,28		Primavera	1
33	1854/05	7-nov	HPP	3a	M	NEG	125	2,09		Primavera	1
34	1855/05	8-nov	HPP	13a	F	NEG	0	0		Primavera	2
35	1856/05	8-nov	HPP	12a	F	NEG	21479,375	4,33		Primavera	1
36	1857/05	8-nov	HPP	6a	M	NEG	7031,875	3,85		Primavera	0
37	1858/05	8-nov	HPP	5a	M	NEG	4188,75	3,62		Primavera	0
38	1859/05	8-nov	HPP	4m	M	NEG	0	0		Primavera	0
39	1871/05	9-nov	HPP	2a	F	NEG				Primavera	0
40	1872/05	9-nov	HPP	5a	F	NEG	59937,5	4,74		Primavera	1
41	2447/05	10-nov	HPP	3a	F	NEG	468125	5,67		Primavera	0
42	2449/05	10-nov	HPP	5a	M	NEG	0	0		Primavera	0
43	2450/05	10-nov	HPP	2a	M	NEG	0	0		Primavera	0
44	2485/05	14-nov	HPP	8a	M	NEG	0	0		Primavera	1
45	2486/05	14-nov	HPP	8m	F	NEG				Primavera	0
46	2487/05	15-nov	HPP	1a	M	NEG				Primavera	0
47	2488/05	15-nov	HPP	5a	F	NEG	62,5	1,8		Primavera	0
48	2504/05	17-nov	HPP	3a	M	NEG	73125	4,86		Primavera	1
49	2505/05	17-nov	HPP	6a	M	NEG	0	0		Primavera	0

Nº	Reg.	Col.	Hos	ID	Sex	PCR	T.Real PCR	Log	Tipo EV	Estação	Escores
50	2506/05	17-nov	HPP	2a	F	NEG				Primavera	1
51	2538/05	20-nov	HPP	12a	F	NEG	0	0		Primavera	1
52	2539/05	21-nov	HPP	7a	M	NEG	102125	5,01		Primavera	0
53	2540/05	21-nov	HPP	7a	M	NEG	0	0		Primavera	0
54	2541/05	21-nov	HPP	8m	M	NEG				Primavera	0
55	2542/05	22-nov	HC	3m	F	NEG				Primavera	0
56	2555/05	22-nov	HPP	1a	M	NEG				Primavera	1
57	2556/05	22-nov	HPP	4a	F	NEG	1597,5	3,20		Primavera	0
58	2567/05	23-nov	HPP	5a	M	NEG				Primavera	0
59	2568/05	23-nov	HPP	5a	F	NEG				Primavera	1
60	2569/05	23-nov	HPP	4a	M	NEG	96687,5	4,99		Primavera	2
61	2566/05	24-nov	HPP	9a	F	NEG	18344,375	4,26		Primavera	1
62	2645/05	24-nov	HPP	6a	M	NEG				Primavera	0
63	2582/05	25-nov	HPP	5m	M	NEG				Primavera	0
64	2600/05	25-nov	HPP	1a	M	NEG	1672375	6,22		Primavera	1
65	2601/05	25-nov	HPP	4a	F	NEG	62,5	1,80		Primavera	0
66	2602/05	26-nov	HPP	3a	F	NEG				Primavera	0
67	2603/05	26-nov	HPP	10m	M	NEG				Primavera	0
68	2609/05	28-nov	HUEC	6a	F	NEG	7245	3,86		Primavera	0
69	2610/04	28-nov	HUEC	7a	M	NEG	0	0		Primavera	0
70	2618/05	28-nov	HPP	2a	M	NEG	1375	3,14		Primavera	0
71	2646/05	29-nov	HPP	6a	M	NEG	58437,5	4,77		Primavera	0
72	2647/05	30-nov	HPP	2a	M	NEG				Primavera	0
73	2690/05	4-dez	HPP	1a	F	NEG				Primavera	0
74	2724/05	7-dez	HPP	6m	F	NEG	0	0		Primavera	0
75	2726/05	7-dez	HPP	4a	M	NEG	1959,375	3,29		Primavera	0
76	2727/05	8-dez	HPP	0	M	ENT	134000	5,13		Primavera	0
77	2761/05	9-dez	HPP	3a	M	NEG				Primavera	0
78	2762/05	9-dez	HPP	2a	F	NEG	0	0		Primavera	0
79	2763/05	9-dez	HPP	2a	M	NEG	143625	5,15		Primavera	0
80	2764/05	10-dez	HPP	5a	F	NEG				Primavera	0
81	2765/05	11-dez	HPP	23d	M	NEG	88625	4,94		Primavera	0
82	2767/05	11-dez	HPP	4a	F	NEG	0	0		Primavera	0
83	2768/05	11-dez	HPP	7a	F	NEG	187,5	2,27		Primavera	1
84	2782/05	12-dez	HPP	5a	M	NEG				Primavera	0
85	2783/05	13-dez	HPP	3a	F	NEG	0	0		Primavera	0
86	2791/05	14-dez	HPP	8a	M	NEG	91312,5	4,96		Primavera	0
87	2792/05	14-dez	HPP	4a	M	NEG	41687,5	4,62		Primavera	0
88	2793/05	14-dez	HPP	2a	M	NEG	47875	4,68		Primavera	1
89	2799/05	15-dez	HPP	4a	M	NEG	1834,375	3,26		Primavera	1
90	2800/05	15-dez	HPP	6a	M	NEG	0	0		Primavera	2
91	2801/05	15-dez	HPP	4m	M	NEG	0	0		Primavera	3
92	3552/06	16-dez	HC	8a	F	NEG				Primavera	4
93	2819/05	17-dez	HPP	3a	F	NEG				Primavera	0
94	2820/05	17-dez	HPP	8m	M	NEG				Primavera	0
95	2821/05	17-dez	HPP	7m	M	NEG				Primavera	0
96	2830/05	19-dez	HPP	12a	F	NEG	0	0		Primavera	1
97	2846/05	20-dez	HPP	20d	M	NEG	105437,5	5,022		Primavera	1
98	2880/05	22-dez	HPP	2a	M	NEG	838,75	2,92		Verão	0

Nº	Reg.	Col.	Hos	ID	Sex	PCR	T.Real PCR	Log	Tipo EV	Estação	Escores
99	2881/05	22-dez	HPP	8a	F	NEG				Verão	0
100	2876/05	24-dez	HPP	4d	M	NEG	0	0		Verão	1
101	2877/05	24-dez	HPP	11a	M	NEG	17890	4,25		Verão	0
102	2879/05	24-dez	HPP	3m	M	NEG				Verão	0
103	2884/05	26-dez	HPP	7a	M	ENT	572562,5	5,76		Verão	1
104	2883/05	26-dez	HPP	10m	F	NEG				Verão	0
105	2894/05	27-dez	HPP	4a	M	NEG	7588,75	3,88		Verão	0
106	2895/05	27-dez	HPP	5a	M	NEG	1438,75	3,16		Verão	0
107	2896/05	27-dez	HPP	7a	M	NEG	80437,5	4,91		Verão	1
108	2898/05	28-dez	HPP	12a	F	ENT	1,21E+11	11,08		Verão	1
109	05/06	1-jan	HPP	5a	M	ENT	8875	3,95		Verão	0
110	39/06	1-jan	HPP	4a	F	ENT	246500	5,39	ECHO30	Verão	0
111	03/06	2-jan	HC	7a	F	ENT	0	0	ECHO4	Verão	0
112	40/06	2-jan	HPP	9a	M	ENT	9275062500	9,97		Verão	1
113	51/06	3-jan	HPP	3a	M	NEG	93000	4,96		Verão	0
114	52/06	3-jan	HPP	9a	F	NEG	0	0		Verão	0
115	60/06	4-jan	HPP	3m	M	ENT	219125	5,34	ECHO30	Verão	2
116	61/06	4-jan	HPP	5a	F	ENT	6550,625	3,82	ECHO30	Verão	0
117	59/06	4-jan	HPP	5a	M	NEG	0	0		Verão	0
118	70/06	6-jan	HPP	1a	F	NEG	38500	4,58		Verão	0
119	94/06	7-jan	HPP	1a	F	NEG	0	0		Verão	0
120	95/06	8-jan	HPP	1a	F	NEG	375	2,57		Verão	0
121	106/06	9-jan	HPP	8a	M	ENT	36381,25	4,56		Verão	0
122	107/06	9-jan	HPP	3a	M	ENT	718,75	2,86		Verão	0
123	108/06	9-jan	HC	2a	M	NEG	0	0		Verão	0
124	109/06	9-jan	HUEC	8m	F	NEG	23750	4,37		Verão	0
125	123/06	10-jan	HPP	6a	M	ENT	15063,75	4,18		Verão	0
126	121/06	10-jan	HPP	13a	M	NEG				Verão	1
127	135/06	11-jan	HC	29a	M	ENT	2,13E+11	11,33		Verão	2
128	134/06	11-jan	HPP	7a	F	NEG	500	2,69		Verão	0
129	138/06	12-jan	HC	9a	F	NEG				Verão	0
130	163/06	14-jan	HPP	5a	F	ENT	12773,125	4,11	ECHO30	Verão	0
131	164/06	15-jan	HPP	7a	F	ENT	87,5	1,94	ECHO30	Verão	0
132	175/06	16-jan	HPP	12a	F	ENT	36756,875	4,57	HPeV	Verão	0
133	166/06	16-jan	HC	14a	M	NEG				Verão	1
134	174/06	16-jan	HPP	10a	M	NEG				Verão	0
135	186/06	17-jan	HPP	8a	M	ENT	155500	5,19	HPeV	Verão	0
136	187/06	17-jan	HPP	10a	M	NEG				Verão	0
137	184/06	18-jan	HC	2a	F	NEG				Verão	0
138	228/06	20-jan	HPP	4a	F	NEG				Verão	0
139	229/06	20-jan	HPP	5a	M	NEG				Verão	0
140	226/06	21-jan	HPP	8a	M	NEG				Verão	0
141	230/06	21-jan	HPP	4a	M	NEG				Verão	0
142	231/06	21-jan	HC	10a	M	NEG				Verão	0
143	256/06	25-jan	HPP	7a	F	NEG				Verão	0
144	258/06	25-jan	HPP	6a	F	NEG				Verão	0
145	274/06	26-jan	HPP	7a	M	NEG				Verão	0
146	275/06	26-jan	HPP	5a	F	NEG				Verão	0
147	276/06	26-jan	HPP	8a	M	NEG	0	0		Verão	0

Nº	Reg.	Col.	Hos	ID	Sex	PCR	T.Real PCR	Log	Tipo EV	Estação	Escores
148	278/06	26-jan	HC	3a	F	NEG	0	0		Verão	0
149	300/06	27-jan	HPP	6a	M	NEG				Verão	0
150	301/06	29-jan	HPP	2a	M	NEG	104937,5	5,02		Verão	1
151	302/06	29-jan	HPP	6a	F	NEG				Verão	1
152	309/06	30-jan	HPP	11a	M	NEG				Verão	0
153	323/06	31-jan	HPP	3a	M	NEG	71312,5	4,85		Verão	1
154	364/06	3-fev	HPP	3a	M	NEG	0	0		Verão	0
155	393/06	3-fev	HPP	3a	F	NEG	0	0		Verão	0
156	367/06	5-fev	HPP	7a	M	NEG				Verão	1
157	368/06	5-fev	HPP	1a	M	NEG	0	0		Verão	0
158	369/06	5-fev	HPP	10m	F	NEG				Verão	0
159	370/06	5-fev	HPP	6m	F	NEG	0	0		Verão	0
160	400/06	8-fev	HPP	9a	M	NEG				Verão	1
161	401/06	8-fev	HPP	12a	M	NEG				Verão	1
162	402/01	8-fev	HPP	11a	M	NEG				Verão	0
163	436/06	10-fev	HPP	4a	M	NEG				Verão	0
164	437/06	10-fev	HPP	7a	M	NEG				Verão	0
165	441/06	11-fev	HPP	4a	F	NEG	0	0		Verão	1
166	458/06	13-fev	HPP	2a	M	ENT	57070,625	4,76		Verão	0
167	483/06	15-fev	HPP	7a	M	NEG				Verão	0
168	485/06	16-fev	HPP	2a	M	NEG	404500	5,6		Verão	2
169	486/06	16-fev	HPP	12a	M	NEG				Verão	0
170	501/06	17-fev	HPP	3a	F	ENT	4068,75	3,61		Verão	0
171	500/06	20-fev	HPP	11a	F	NEG				Verão	0
172	509/02	20-fev	HPP	12a	F	NEG				Verão	0
173	520/06	20-fev	HC	4a	F	NEG				Verão	0
174	530/06	21-fev	HPP	8a	M	ENT	156937,5	5,2		Verão	0
175	522/06	21-fev	HC	7a3m	M	NEG				Verão	0
176	531/06	22-fev	HPP	7m	F	NEG	0	0		Verão	0
177	540/06	23-fev	HC	11a	M	ENT	87,5	1,94	ECHO30	Verão	0
178	556/06	23-fev	HC	9a3m	F	NEG				Verão	0
179	558/06	23-fev	HC	2a10m	F	NEG	13562,5	4,13		Verão	1
180	564/06	24-fev	HPP	1a	M	NEG	279500	5,44		Verão	2
181	565/06	24-fev	HC	9a	M	NEG				Verão	0
182	616/06	24-fev	HPP	7m	M	NEG	1092875	6,03		Verão	0
183	621/06	24-fev	HPP	4a	M	NEG				Verão	0
184	622/06	24-fev	HPP	11a	M	NEG				Verão	0
185	618/06	25-fev	HPP	6a	M	NEG				Verão	0
186	619/06	25-fev	HPP	3a	F	NEG				Verão	1
187	620/06	25-fev	HPP	4a	F	NEG				Verão	0
188	598/06	26-fev	HPP	5a	M	NEG				Verão	0
189	615/06	26-fev	HPP	9a	F	NEG				Verão	0
190	617/06	26-fev	HPP	9a	M	NEG				Verão	0
191	614/06	2-mar	HPP	7a	F	ENT	86937,5	4,94		Verão	0
192	610/06	2-mar	HPP	6a	M	NEG				Verão	0
193	611/06	2-mar	HPP	3a	M	NEG	1250	3,09		Verão	0
194	613/06	2-mar	HPP	5a	M	NEG				Verão	0
195	632/06	3-mar	HPP	3a	M	NEG	24250	4,38		Verão	0
196	633/06	6-mar	HPP	9a	M	NEG				Verão	0

Nº	Reg.	Col.	Hos	ID	Sex	PCR	T.Real PCR	Log	Tipo EV	Estação	Escores
197	676/06	6-mar	HPP	5a	M	NEG				Verão	0
198	677/06	6-mar	HPP	13a	F	NEG				Verão	0
199	679/06	6-mar	HPP	5a	M	NEG				Verão	0
200	683/06	6-mar	HPP	5a	M	NEG				Verão	0
201	685/06	8-mar	HPP	3a	F	NEG	42937,5	4,63		Verão	0
202	689/06	8-mar	HC	11a6m	M	NEG				Verão	0
203	699/06	9-mar	HPP	11a	F	ENT	177562,5	5,25	HPeV	Verão	1
204	701/06	9-mar	HPP	5a	M	NEG				Verão	1
205	702/06	9-mar	HPP	3a	M	NEG				Verão	0
206	703/06	9-mar	HC	4a	M	NEG				Verão	0
207	704/06	10-mar	HC	4a8m	M	NEG				Verão	0
208	717/06	10-mar	HPP	4a	M	NEG				Verão	0
209	719/06	11-mar	HPP	11a	M	NEG				Verão	1
210	720/06	11-mar	HPP	11a	M	NEG				Verão	0
211	721/06	11-mar	HPP	11a	F	NEG				Verão	0
212	722/06	11-mar	HPP	6a	F	NEG				Verão	0
213	735/06	13-mar	HPP	3a	M	ENT	103062,5	5,01		Verão	0
214	725/06	13-mar	HC	8a11m	M	NEG				Verão	0
215	734/06	13-mar	HPP	7a	F	NEG				Verão	1
216	738/06	13-mar	HPP	4a	M	NEG				Verão	0
217	747/06	14-mar	HPP	6a	M	NEG				Verão	0
218	756/06	15-mar	HPP	7a	F	ENT	33653,75	4,53		Verão	0
219	757/06	15-mar	HPP	3a	M	ENT	58755,625	4,77		Verão	0
220	767/06	16-mar	HPP	6a	F	ENT	112500	5,05	ECHO4	Verão	0
221	768/06	16-mar	HPP	5a	M	ENT	76562,5	4,88		Verão	0
222	769/06	16-mar	HC	12a5m	M	NEG				Verão	0
223	795/06	17-mar	HPP	3a	M	NEG	1062,5	3,02		Verão	0
224	793/06	18-mar	HPP	9a	M	NEG				Verão	0
225	796/06	19-mar	HPP	6a	F	NEG				Verão	0
226	800/06	20-mar	HC	7a	M	ENT	309937,5	5,49		Verão	0
227	808/06	20-mar	HPP	6a	F	ENT	102312,5	5,01		Verão	0
228	794/06	20-mar	HPP	3a	F	NEG	692000	5,84		Verão	0
229	799/06	20-mar	HC	5a	M	NEG	67125	4,82		Verão	0
230	810/06	21-mar	HPP	1a	M	ENT	19053,125	4,28		Outono	2
231	820/06	22-mar	HC	7a	M	ENT	31064,375	4,49	HPeV	Outono	1
232	828/06	22-mar	HPP	7a	M	ENT	1588,125	3,2		Outono	1
233	826/06	22-mar	HPP	2a	F	NEG	236625	5,37		Outono	1
234	829/06	22-mar	HPP	1a	F	NEG	562,5	2,75		Outono	1
235	827/06	23-mar	HPP	11a	M	NEG				Outono	1
236	839/06	23-mar	HPP	13a	M	NEG				Outono	1
237	840/06	23-mar	HPP	6a	F	NEG				Outono	1
238	841/06	23-mar	HPP	5a	M	NEG				Outono	1
239	866/06	24-mar	HPP	5a	F	ENT	466562,5	5,67		Outono	1
240	865/06	24-mar	HPP	5a	F	NEG				Outono	1
241	589/06	26-mar	HC	11m11d	M	NEG	0	0		Outono	1
242	860/06	26-mar	HPP	3a	F	NEG	681750	5,83		Outono	1
243	861/06	26-mar	HPP	2a	M	NEG				Outono	1
244	868/06	26-mar	HPP	14a	M	NEG				Outono	1
245	870/06	27-mar	HC	25a	M	NEG				Outono	1

Nº	Reg.	Col.	Hos	ID	Sex	PCR	T.Real PCR	Log	Tipo EV	Estação	Escores
246	884/06	27-mar	HC	6a	F	NEG				Outono	1
247	885/06	27-mar	HPP	9a	F	NEG				Outono	1
248	896/06	28-mar	HPP	4a	F	ENT	45497,5	4,66		Outono	1
249	897/06	28-mar	HPP	8a	F	ENT	572250	5,76		Outono	1
250	895/06	28-mar	HPP	10a	M	NEG				Outono	1
251	898/06	28-mar	HPP	8m	M	NEG				Outono	1
252	899/06	28-mar	HPP	4a	M	NEG				Outono	1
253	900/06	29-mar	HC	1a9m	F	NEG				Outono	1
254	901/06	29-mar	HPP	4a	F	NEG				Outono	1
255	902/06	29-mar	HPP	6a	F	NEG				Verão	0
256	903/06	30-mar	HPP	8a	M	NEG				Verão	0
257	904/06	30-mar	HPP	9a	F	NEG				Verão	0
258	905/06	30-mar	HPP	7a	M	NEG				Verão	1
259	914/06	30-mar	HC	10a	M	NEG				Verão	0
260	932/06	30-mar	HPP	3a	M	NEG				Verão	0
261	933/06	30-mar	HPP	2a	M	NEG				Verão	0
262	935/06	30-mar	HPP	6a	F	NEG				Verão	0
263	936/06	30-mar	HC	3a1m	F	NEG				Verão	0
264	957/06	31-mar	HPP	10a	M	NEG				Verão	1
265	958/06	31-mar	HPP	12a	M	NEG				Verão	0
266	959/06	31-mar	HPP	5a	F	NEG				Verão	0
267	953/06	2-abr	HPP	2a	M	NEG				Verão	0
268	954/06	2-abr	HPP	8a	M	NEG				Verão	0
269	955/06	2-abr	HPP	4a	M	NEG				Verão	0
270	956/06	2-abr	HPP	8a	M	NEG				Verão	0
271	961/06	3-abr	HC	7a8m	F	NEG				Verão	0
272	970/06	3-abr	HPP	8a	M	NEG				Verão	0
273	971/06	3-abr	HPP	6a	F	NEG				Verão	0
274	972/06	4-abr	HC	4a4m	F	NEG				Verão	0
275	987/06	4-abr	HPP	5a	M	NEG				Verão	0
276	994/06	5-abr	HPP	4a	M	NEG	937,5	2,97		Verão	0
277	995/06	5-abr	HPP	3a	M	NEG				Verão	0
278	1008/06	7-abr	HC	12a	M	NEG				Verão	0
279	1019/06	7-abr	HPP	4a	M	NEG				Outono	2
280	1024/06	7-abr	HPP	3a	F	NEG				Outono	1
281	1020/06	8-abr	HPP	1a	M	NEG				Outono	1
282	1021/06	8-abr	HPP	3a	M	NEG				Outono	1
283	1025/06	10-abr	HC	11a	M	NEG				Outono	1
284	1038/06	10-abr	HPP	5a	F	NEG				Outono	1
285	1057/06	11-abr	HPP	6a	F	NEG				Outono	1
286	1058/06	11-abr	HPP	8a	F	NEG				Outono	1
287	1092/06	12-abr	HPP	7a	M	NEG				Outono	1
288	1093/06	12-abr	HPP	14a	M	NEG				Outono	1
289	1064/06	13-abr	HC	6a5m	F	NEG				Outono	1
290	1083/06	13-abr	HPP	5a	M	NEG				Outono	1
291	1086/06	15-abr	HPP	4a	F	NEG				Outono	1
292	1089/06	16-abr	HPP	7a	M	NEG				Outono	1
293	1133/06	19-abr	HPP	7a	M	NEG				Outono	1
294	1134/06	19-abr	HPP	5a	M	NEG				Outono	1

Nº	Reg.	Col.	Hos	ID	Sex	PCR	T.Real PCR	Log	Tipo EV	Estação	Escores
295	1153/06	20-abr	HPP	6a	F	NEG				Outono	1
296	1155/06	20-abr	HPP	2a	F	NEG				Outono	1
297	1156/06	21-abr	HPP	1a	M	NEG				Outono	1
298	1160/06	21-abr	HPP	4a	M	NEG				Outono	1
299	1152/06	22-abr	HPP	17a	M	NEG				Outono	1
300	1154/06	23-abr	HPP	3a	F	NEG				Outono	1
301	1161/06	23-abr	HPP	4a	M	NEG				Outono	1
302	1173/06	24-abr	HPP	2a	M	NEG				Outono	1
303	1188/06	25-abr	HPP	6a	F	NEG				Outono	1
304	1189/06	25-abr	HPP	2a	F	NEG				Outono	1
305	1190/06	25-abr	HPP	5a	F	NEG				Outono	1
306	1191/06	25-abr	HPP	5a	F	NEG				Outono	1
307	1196/06	26-abr	HPP	9a	M	NEG				Outono	1
308	1197/06	26-abr	HPP	3a	F	NEG				Outono	1
309	1198/06	26-abr	HPP	5a	M	NEG				Outono	1
310	1199/06	26-abr	HPP	7a	M	NEG				Outono	1
311	1216/06	27-abr	HPP	9a	M	NEG				Outono	1
312	1217/06	27-abr	HPP	4a	F	NEG				Outono	1
313	1218/06	27-abr	HPP	5a	F	NEG				Outono	1
314	1228/06	28-abr	HPP	12a	M	NEG				Outono	1
315	1251/06	28-abr	HC	8a	M	NEG				Outono	1
316	1250/06	30-abr	HC	2a	F	NEG				Outono	1
317	1298/06	6-mai	HPP	4m	F	NEG	241062,5	5,38		Outono	1
318	1315/06	8-mai	HPP	1m	F	NEG				Outono	1
319	1343/06	10-mai	HPP	8a	F	NEG				Outono	1
320	1353/06	11-mai	HC	6a	M	NEG				Outono	1
321	1513/06	11-mai	HC	4a	M	NEG				Outono	1
322	1388/06	15-mai	HPP	3a	M	NEG	1937,5	3,28		Outono	1
323	1389/05	15-mai	HPP	2a	F	NEG	0	0		Outono	2
324	1399/06	16-mai	HPP	7a	F	NEG				Outono	1
325	1400/06	16-mai	HPP	4a	M	NEG				Outono	1
326	1462/06	20-mai	HC	12a	F	NEG				Outono	1
327	1457/06	21-mai	HPP	6a	F	NEG				Outono	1
328	1459/06	21-mai	HPP	2a	M	NEG	0	0		Outono	1
329	1492/06	24-mai	HPP	5a	M	NEG				Outono	1
330	1521/06	26-mai	HPP	6a	M	NEG				Outono	1
331	1524/06	26-mai	HPP	1a	F	NEG	8500	3,92		Outono	1
332	1522/06	27-mai	HPP	5a	F	NEG				Outono	1
333	1602/06	2-jun	HPP	6a	M	NEG				Outono	1
334	1604/06	2-jun	HPP	3a	M	NEG	0	0		Outono	1
335	1603/06	3-jun	HPP	2a	F	NEG	125	2,09		Outono	1
336	1606/06	4-jun	HPP	3a	M	NEG	23125	4,36		Outono	1
337	1623/06	5-jun	HPP	8a	M	NEG				Outono	1
338	1655/06	7-jun	HPP	4a	F	NEG				Outono	1
339	1656/06	7-jun	HPP	3a	M	NEG	13125	4,11		Outono	1
340	1657/06	7-jun	HPP	5a	F	NEG				Outono	1
341	1702/06	10-jun	HPP	6a	F	NEG				Outono	1
342	1740/06	13-jun	HPP	6a	M	NEG				Outono	1
343	1766/06	15-jun	HPP	3a	M	NEG	0	0		Outono	1

Nº	Reg.	Col.	Hos	ID	Sex	PCR	T.Real PCR	Log	Tipo EV	Estação	Escores
344	1770/06	16-jun	HPP	8a	M	ENT	0	0		Outono	2
345	1769/06	18-jun	HPP	6a	M	NEG				Outono	1
346	1780/06	19-jun	HPP	7a	M	NEG				Outono	1
347	1781/06	19-jun	HPP	7a	M	NEG				Outono	1
348	1782/06	19-jun	HPP	6a	F	NEG				Outono	1
349	1811/06	21-jun	HPP	3a	F	NEG				Outono	1
350	1812/06	21-jun	HPP	12a	M	NEG				Outono	1
351	1846/06	23-jun	HPP	15a	F	NEG	0	0		Inverno	2
352	1876/06	26-jun	HPP	2a	F	NEG	0	0		Inverno	1
353	1878/06	26-jun	HPP	3a	F	NEG	67125	4,82		Outono	1
354	1879/06	26-jun	HPP	11a	F	NEG				Outono	1
355	1874/06	27-jun	HPP	5a	M	NEG				Outono	1
356	1875/06	27-jun	HPP	7a	M	NEG				Outono	1
357	1891/06	28-jun	HPP	9a	M	NEG				Outono	1
358	1910/06	29-jun	HPP	10a	F	NEG				Outono	1
359	1935/06	1-jul	HC	5a	M	NEG				Outono	1
360	1969/06	05/jul	HC	7a6m	F	NEG				Outono	1
361	2072/06	17/jul	HC	3a	F	NEG	1250	3,09		Outono	1
362	2147/06	24/jul	HC	5a	M	NEG				Outono	1
363	2172/06	26/jul	HC	4a	F	NEG				Outono	1
364	2429/06	18/ago	HC	5a	M	NEG				Outono	1
365	2474/06	21/ago	HC	8a	M	NEG				Outono	1
366	2483/06	24/ago	HC	13a	F	NEG				Outono	1
367	2515/06	28/ago	HC	5a	F	ENT	75062,5	4,88		Outono	1
368	2535/06	30/ago	HC	6a	F	NEG				Outono	1
369	2559/06	01/set	HC	9a	F	NEG				Outono	1
370	2574/06	02/set	HC	5a	F	NEG				Outono	1
371	2598/06	02/set	HC	19a	F	NEG				Outono	1
372	2599/06	04/set	HC	15a	M	NEG				Outono	2
373	2625/06	07/set	HC	7a	M	NEG				Outono	1
374	2684/06	14/set	HC	1a	M	NEG	0	0		Outono	1
375	2750/06	17/set	HC	13a	M	NEG				Outono	1
376	2723/06	18/set	HC	12a	M	NEG				Outono	1
377	2751/06	21/set	HC	4a	F	NEG				Outono	1
378	2780/06	24/set	HC	8a	F	NEG	227812,5	5,35		Outono	1
379	2804/06	26/set	HC	5a	M	NEG				Outono	1
380	2813/06	27/set	HC	4a	M	NEG				Outono	1
381	2823/06	29/set	HC	4a	M	NEG				Outono	1
382	2824/06	30/set	HC	5a	M	NEG				Outono	1
383	2825/06	02/out	HC	42a	F	NEG	0	0		Outono	1
384	2859/06	03/out	HC	4a	M	NEG				Outono	1
385	2892/06	05/out	HC	6a	M	NEG				Outono	1
386	2904/06	06/out	HC	7a	M	NEG				Outono	1
387	2915/06	06/out	HC	5a	M	NEG				Outono	1
388	2938/06	06/out	HC	14a	F	NEG				Outono	1
389	2940/06	07/out	HC	20a	M	NEG				Outono	1
390	2984/06	07/out	HC	32a	F	NEG	0	0		Outono	1
391	2918/06	09/out	HC	78a	F	NEG	0	0		Outono	1
392	2919/06	09/out	HC	16a	F	NEG	0	0		Outono	1

Nº	Reg.	Col.	Hos	ID	Sex	PCR	T.Real PCR	Log	Tipo EV	Estação	Escores
393	2921/06	09/out	HC	10a	M	NEG				Outono	2
394	2974/06	12/out	HC	5a	M	NEG				Outono	1
395	3014/06	14-out	HC	41a	M	NEG				Outono	1
396	2986/06	15/out	HC	6a	F	NEG				Outono	1
397	2988/06	15/out	HC	5a	M	NEG				Outono	1
398	2987/06	16/out	HC	4a	M	NEG				Outono	1
399	3110/06	25-out	HC	3m	F	ENT/EBV	29284	5,43		Outono	1
400	3114/06	25-out	HC	7a	M	NEG	0	0		Inverno	2
401	3115/06	26-out	HC	19a	F	ENT	MI	MI		Inverno	1
402	3125/06	26-out	HC	9a	M	NEG	187,5	2,27		Outono	1
403	3133/06	27-out	HC	6a	M	NEG				Outono	1
404	3136/06	27-out	HC	8m	M	NEG				Outono	1
405	3185/06	31-out	HC	6a	F	NEG	3268,75	3,51		Outono	1
406	3186/06	31-out	HC	7a	M	NEG				Outono	1
407	3193/06	1-nov	HC	13a	F	NEG	415500	5,62		Outono	1
408	3198/06	2-nov	HC	11a	M	NEG	0	0		Outono	1
409	3199/06	3-nov	HC	11a	M	NEG	62,5	1,8		Outono	1
410	3214/06	6-nov	HC	6a	M	ENT	MI	MI		Outono	1
411	3212/06	6-nov	HC	10a	F	NEG	781,25	2,89		Outono	1
412	3213/06	6-nov	HC	8a	F	NEG	31125	4,49		Outono	1
413	3240/06	8-nov	HC	7a	M	NEG				Outono	1
414	3267/06	10-nov	HC	5a8m	M	NEG	12756,25	4,11		Outono	1
415	3293/06	14-nov	HC	4a	M	ENT	MI	MI		Outono	1
416	3296/06	15-nov	HC	7a	F	NEG	36375	4,56		Outono	1
417	3295/06	16-nov	HC	9a	M	ENT	MI	MI		Outono	1
418	3303/06	16-nov	HC	7a	M	NEG				Outono	1
419	3304/06	16-nov	HC	23a	F	NEG	71687,5	4,85		Outono	1
420	3305/06	16-nov	HC	6a	M	NEG	15643,75	4,19		Outono	1
421	3348/06	22-nov	HC	7m	M	NEG	153687,5	5,18		Outono	2
422	3372/06	24-nov	HC	6a	F	NEG	656,25	2,82		Outono	1
423	3388/06	26-nov	HC	9a	F	ENT	270875	5,43		Outono	1
424	3407/06	28-nov	HC	6a	F	NEG	0	0		Outono	1
425	3409/06	29-nov	HC	5a	F	ENT	46600	4,67		Outono	1
426	3427/06	1-dez	HC	21a	F	NEG				Outono	1
427	3430/06	2-dez	HC	8a	M	NEG	250	2,40		Outono	1
428	3429/06	3-dez	HC	2a	M	ENT	46349,375	4,67		Outono	1
429	3428/06	5-dez	HC	5a	F	NEG				Outono	1
430	3443/06	5-dez	HC	5a	M	NEG				Outono	1
431	3463/06	6-dez	HC	6a	M	NEG	1843,75	3,27		Outono	1
432	3478/06	7-dez	HC	18a	F	NEG	1250	3,09		Outono	1
433	3482/06	8-dez	HC	13a	M	NEG				Outono	1
434	3485/06	9-dez	HC	7a	F	NEG				Outono	1
435	3486/06	10-dez	HC	2a	M	NEG	10562,5	4,02		Outono	1
436	3522/06	12-dez	HC	5a	F	NEG				Outono	1
437	3523/06	13-dez	HC	5a	F	NEG				Outono	1
438	3528/06	14-dez	HC	9a	F	NEG	21056,25	4,32		Outono	1
439	3551/06	16-dez	HC	7a	F	NEG				Outono	1
440	07/06	29-dez	HPP	8a	M	NEG	62,5	1,8		Verão	0

Legenda: Reg= identificação amostra; Col=data coleta amostra; ID=idade (anos); Al= ácido láctico

APÊNDICE 5
ARTIGO PUBLICADO

Enterovirus and herpesviridae family as etiologic agents of lymphomonocytary meningitis, Southern Brazil

Luine Rosele Renaud Vidal¹, Sérgio Monteiro de Almeida²,
Iara José de Messias-Reason³, Meri Bordignon Nogueira⁴,
Maria do Carmo Debur⁵, Luís Felipe Cavalli Pessa⁶,
Luciane Aparecida Pereira⁶, Indianara Rotta⁷,
Gislene Reche de Almeida Takahashi⁸, Clyete Santos da Silveira⁸,
Josianne Maria Reimann Araújo⁹, Sonia Mara Raboni¹⁰

ABSTRACT

Viral meningitis is a common infectious disease of the central nervous system (CNS) that occurs worldwide. The aim of this study was to identify the etiologic agent of lymphomonocytary meningitis in Curitiba, PR, Brazil. During the period of July 2005 to December 2006, 460 cerebrospinal fluid (CSF) samples with lymphomonocytary meningitis were analyzed by PCR methodologies. Fifty nine (12.8%) samples were positive. Enteroviruses was present in 49 (83%) samples and herpes virus family in 10 (17%), of these 6 (10%) herpes simplex virus, 1 (2%) Epstein Barr virus, 2 (3%) human herpes virus type 6 and 1 (2%) mixed infection of enterovirus and Epstein Barr virus. As conclusion enterovirus was the most frequent virus, with circulation during summer and was observed with higher frequency between 4 to 17 years of age. PCR methodology is an important method for rapid detection of RNA enterovirus and DNA herpesvirus in CSF.

Key words: aseptic meningitis, lymphocytic meningitis, lymphomonocytary meningitis, cerebrospinal fluid, central nervous system, enterovirus, herpesvirus.

Enterovirus e família herpesviridae como agentes etiológicos de meningites linfomonocitárias, no sul do Brasil

RESUMO

A meningite viral é uma síndrome infecciosa comum do sistema nervoso central (SNC), que ocorre no mundo inteiro. O objetivo deste estudo foi identificar o agente etiológico de meningite linfomonocitária em Curitiba, PR, Brasil. Durante o período de julho de 2005 a dezembro de 2006, 460 amostras com meningite linfomonocitária foram analisadas por metodologias de PCR. Cinquenta e nove (12,8%) amostras foram positivas. Enterovirus estava presente em 49 (83%) amostras e herpes vírus em 10 (17%), destas 6 (10%) HSV, 1 (2%) EBV, 2 (3%) HHV- 6 e 1 (2%) infecção mista de enterovirus e EBV. Conclui-se que o enterovirus foi o vírus mais frequente, com a circulação durante o verão. Houve maior número de amostras positivas entre 4 a 17 anos. A metodologia de PCR é um importante método para a detecção rápida de RNA de enterovirus e DNA do herpesvirus no LCR.

Palavras-chave: meningite asséptica, meningite linfocítica, meningite linfomonocitária, líquido cefalorraquidiano, sistema nervoso central, enterovirus, herpesvirus.

Correspondence

Sérgio Monteiro de Almeida
Hospital de Clínicas (UFPR)
Setor Análises Clínicas
Laboratório de Virologia
Rua Padre Camargo 280
80060-240 Curitiba PR - Brasil
E-mail: sergio.ma@pop.com.br

Support

SETI - Secretaria de Ciência e
Tecnologia do Estado do Paraná

Received 28 September 2010
Received in final form 4 January 2011
Accepted 13 January 2011

¹Pharmacist, MD Student of Postgraduate Program of Pharmacy Science from Universidade Federal do Paraná (UFPR), Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Curitiba PR, Brazil; ²Medical Doctor, PhD, Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, UFPR, Curitiba PR, Brazil; ³Peel Pequeno Príncipe Research Institute, Curitiba PR, Brazil; ⁴Pharmacist PhD, Immunopathology Laboratory, Hospital de Clínicas, UFPR; ⁵Pharmacist PhD, Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, UFPR; ⁶Pharmacist MS, Laboratório Central do Estado do Paraná, LACEN, Curitiba PR, Brazil; ⁷Biologist, Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Curitiba PR, Brazil; ⁸Pharmacist, Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Curitiba PR, Brazil; ⁹Technician, Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, Curitiba PR, Brazil; ¹⁰Physician, Secretaria Municipal de Saúde do Estado do Paraná; ¹¹Medical Doctor, PhD, Virology Laboratory, Hospital de Clínicas, UFPR.

Viral meningitis is a common infectious disease of the central nervous system (CNS) that occurs worldwide, especially during the summer. Almost 90% of cases are caused by enterovirus such as, coxsackievirus and echovirus which contain several serotypes¹. They are easily transmitted by direct contact with respiratory secretions that can cause epidemic outbreaks with high financial impact and morbidity rates. These viruses are typically geographically confined and some serotypes may arise in endemic regions, with gradual changes in the predominant serotypes present year to year^{1,2}. Enterovirus meningitis is the most common agent identified in most viral meningitis cases, followed by *herpesviridae* family viruses³. Viral meningitis is responsible for approximately 50% of inpatients with meningitis in the city of Curitiba, Southern Brazil⁴.

The number of notified cases of meningitis from all etiologies (bacterial, viral and not otherwise specified) in Curitiba from 1995 to 2003 was from 612 to 896. It is estimated that 40% of the meningitis cases were caused by viruses and the coefficient for the incidence of viral meningitis was around 29 cases/100,000 inhabitants⁴. There is little information on the etiology of viral meningitis in Brazil especially in the Southern region. In this study we identified the etiologic agent of viral meningitis that occurred in Curitiba, the capital of Paraná State, in Southern Brazil, in the July 2005 to December 2006 period using biology molecular approaches.

METHOD

The city of Curitiba is located in the southern Brazil at an altitude of 934.6 m, and has subtropical climate. It is the seventh largest city in Brazil with a population of around 1,850,000 inhabitants and a population density of 4,202.83 hab/km. In the period of July 2005 to December 2006 a total of 671 cerebrospinal fluid (CSF) samples were collected from patients with clinical suspicion of lymphomonocytary meningitis seen at three different reference hospitals in Curitiba (Hospital Universitário Evangélico, Hospital Pequeno Príncipe and Hospital de Clínicas-UFPR). CSF samples were stored in a RNA/DNase free and sterile tube and sent to the virology laboratory for less than 24 hours, on ice. There was a label on each sample containing epidemiological and clinical data the samples were stored at -70°C until molecular analysis.

Inclusion criteria – CSF samples were included in the study based on the clinical criteria of meningitis: acute onset (<3 weeks), presence of fever ($>38^{\circ}\text{C}$), meningo-radicular signs and headache. CSF biochemical and cytological pattern of viral meningitis are: WBCs ≥ 5 cells/ mm^3 with predominance of lymphocytes, CSF glucose normal (>45 mg/dL), CSF lactate <3.5 mmol/L⁵.

Exclusion criteria – [1] Clinical diagnosis of encephalitis, defined as acute onset (<3 weeks), the presence of fever ($>38^{\circ}\text{C}$) and signs or symptoms that suggested brain parenchyma involvement (consciousness and/or personality alterations, seizures or focal neurological signs)⁶; [2] Samples with CSF biochemical and cytological characteristics of bacterial meningitis: WBCs >5 cells/ mm^3 with predominance of neutrophils, low CSF glucose normal (<45 mg/dL), CSF lactate >3.5 mmol/L; [3] Samples improperly stored, non-refrigerated samples or sent improperly to the virology section; [4] Identification in CSF of an etiologic agent other than virus.

CSF total protein was quantified by the sulphosalicylic acid turbidimetric method and CSF glucose by the enzymatic method. CSF total cell count (WBCs) was assessed using a Fuchs Rosenthal chamber. For differential cell count CSF samples were concentrated in a cyto-spin and the slides stained by the May Grünwald-Giemsa technique.

The study was approved by the Ethical and Research Committee on Humans Beings from the Hospital de Clínicas, UFPR.

Extraction of viral RNA/DNA

The extraction of viral RNA or DNA was followed by a previously described protocol⁷. Briefly, 200 μL of lysis buffer (Guanidine Isothiocyanate (GuSCN), Invitrogen (USA) 4 M, 0.5% of N-Lauroylsarcosine salt solution, Fluka (USA), 1 mM dithiothreitol (DTT), Invitrogen (USA), 25 mM sodium citrate, Sigma (USA), 20 $\mu\text{g}/\text{tube}$ of glycogen, Sigma (USA), 100 copies of plasmid with pseudo rabies virus (PRV), used as internal control were added to 50 μL of CSF. After, vortexed tube was incubated room temperature for 10 minutes. 250 μL of isopropyl alcohol (-20°C) was added, vortexed and centrifuged for 10 minutes, 17,000 rpm at 4°C . Pellet was washed with 500 μL of ethanol 70, centrifuged as described. Supernatant was discarded and the open tube incubated at 56°C for 10 minutes. The dried pellet was resuspended in ultrapure water and stored at -70°C .

Reverse transcription

Viral RNA was transcribed to obtain cDNA as described elsewhere⁸. The master mix was prepared in a volume of 17.5 $\mu\text{L}/\text{tube}$. The mix contained dideoxynucleotides triphosphates 2.5 mM (dNTPs), 5X buffer (Invitrogen, USA), dithiothreitol (DTT) 0.1 M (Invitrogen, USA), 0.25 μL of RNase Out (Invitrogen, USA) and transcriptase enzyme Superscript II (Invitrogen, USA) 0.25 μL . 0.5 μL of the enterovirus antisense primer was added to 10 μL of the extracted product. After 2 minutes at 94°C ice cooling, 17.5 μL of the mix was added to the tube, which was stored at 45°C for 1 hour.

Amplification - PCR

Enterovirus – PCR for enterovirus was based on the amplification of the 5'-UTR region of the gene, which is a highly conserved region in most enterovirus serotypes according to Casas et al.⁹. For the first PCR the primer sequences were: EV1- Reverse 5'GAAACACG-GACACCAAAGTAGTCG3' and EV1 - Forward 5'CG-GTACCTTTGTRCGCCTGTTTAA3'. The amplification consisted of two rounds. For the first PCR the master mix contained 10 mM Tris-HCL (pH 8.8), 3.5 mM MgCl₂, 2.5 mM KCl, 1.5 U of Taq polymerase and 0.5 µL of each external primer in a concentration of 10 pmol, the final volume was adjusted with ultra pure water to 22.5 µL and 2.5 µL of cDNA. The amplification was performed with an Eppendorf thermocycler in one cycle of 94°C for 2 minutes, followed by 40 cycles: 94°C for 30 seconds, 48°C for 30 seconds and 72°C for 2 minutes, after extension on 72°C for 10 minutes. For the second PCR the primer sequences were as follows: EV2 - Reverse 5'GGATTAGCCGCATTCAGGG3'; EV2 - Forward 5'CAAGCACTTCTGTTTCCCG3'. Master mix for the second PCR was described above and the volume of Taq polymerase was 0.25 µL. 0.5 µL from the first amplification product and 24.5 µL from the mix were used. The second amplification was performed with an Eppendorf thermocycler in one cycle of 94°C for 2 minutes, followed by 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 52°C for 30 seconds, 72°C for 1 minute, after an extension on 72°C for 10 minutes. Amplification products were analyzed in 1% agarosis gel. The expected product for enterovirus was of 306-316 pb and for the internal control, PRV 147 pb.

Herpesviridae family – The herpesviruses were identified by the methodology described by Johnson et al.¹⁰, which was standardized to detect eight species of human herpesviruses. Primers were designed for a well conserved region of the DNA polymerase gene. The first pair of primers (PAN1) was used to amplify herpes simplex virus type 1 (HSV-1), herpes simplex virus type 2 (HSV-2), Epstein Barr virus (EBV), Cytomegalovirus (CMV), and human herpes virus type 8 (HHV-8) and had the following sequences: HSV-P1 - 5'-GTGGTG-GACTTTGCCAGCCTGTACCC-3' and HSV-P2 - 5'-TAAACATGGAGTCCGTGTCGCCGTAGATGA-3'. The primer pair 2 (PAN2) was used to amplify varicella zoster virus (VZV), human herpes virus type 6 (HHV-6) (variant A or B), and HHV-7 presented the following sequence VZV-P1 - 5'-TCGTGTTTGATTTTCAAAGTT-TATATCC-3' and VZV-P2 5'-ATAAACACACAATCC-GTATCACCATAAATAACCT-3'. Polymerase Chain Reaction was performed in a total volume of 25 µL. The mix contained 2.5 µL of 10X buffer (Invitrogen, USA), 0.75 µL magnesium chloride (MgCl₂) 50 mM (Invit-

rogen), 8 µL dNTPs 1.25 mM (Invitrogen), 1.25 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck), 1.75 µL of each primer in a concentration of 37.5 pmol, 0.35 µL de Taq polymerase (Invitrogen), ultra pure water and 2.5 µL from DNA. The amplification was performed with an Eppendorf cycler. For the first pair of primers the cycle was as follows: 1 cycle 95°C for 12 minutes, 3 cycles of 95°C for 1 minute, 60°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, 37 cycles of 95°C for 1 minute, 55°C for 45 seconds, 72°C for 1 minute, 1 cycle 72°C for 3 minutes. For the second pair of primers the cycles were: 1 cycle 95°C for 12 minutes, 40 cycles of 95°C for 1 minute, 47°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, 1 cycle 72°C for 3 minutes. The amplification products were analyzed by electrophoresis using 1% agarosis gel. The expected product for PAN 1 was 532 bp and for PAN 2 536 bp. For each reaction positive and negative samples as well as water were used as controls.

Restriction enzyme digestion

Samples with products of approximately 532 or 536 bp were selected for enzyme digestion. Each reaction mixture in which amplicons were detected was subjected to digestion with the restriction enzymes *Bam*HI and *Bst*UI (New England Biolabs, USA). The digestion mixture consisted of 10 µL of PCR mixture, 1.5 µL of the appropriate enzyme buffer, 1 µL of enzyme, and 2.5 µL of double-distilled water for a total volume of 15 µL. The reaction mixtures were incubated for 1 h at 37°C (*Bam*HI) or 60°C (*Bst*UI)¹⁰.

Statistical analysis

Variables were compared using Student T test, Chi Square and Mann Whitney tests, as appropriated. Results are shown as mean and standard deviation or frequencies and percentage. A p value <0.05 was considered significant.

RESULTS

During the July 2005 to December 2006 period a total 671 CSF samples were evaluated, with 460 samples (460 patients) fulfilling the inclusion criteria for the study. A total 59/460 (12.8%) samples showed positive results for enterovirus (n=48), herpes simplex virus (n=6), Epstein Barr virus (n=1), human herpes virus type 6 (n=2) and a mixed infection with both enterovirus and Epstein Barr virus (n=1). Enteroviruses represented 83% of positive samples herpes virus family 17%. Samples of herpesvirus samples were digested by restriction enzymes and identified according to the pattern of the signals in the agarosis gel being 6 (10%) for herpes simplex virus, 1 (2%) for Epstein Barr virus and 2 (3%) for human herpes virus type 6 and 1 (2%) co infection of enterovirus and Epstein Barr virus (Fig 1). CMV, VZV, HHV-7, HHV-8 were not

Table 1. Laboratorial findings of CSF positives and negatives samples based on cellular and biochemical features.

	Negative samples			Positive samples			p
	Mean±SD	IQR	Median	Mean±SD	IQR	Median	
RBC cell/mm ³	580±2890	1-48	5	36.9±183	0.6-13.5	2	0.0071*
WBC cell/mm ³	163±271	24-181	80	170.4±279	16-183.5	98	0.7987
Neutrophils (%)	6±17	0-1	1	34.3±33.4	8.5-58.5	28	0.3401
Lymphocytes (%)	80.6±90	51-99	96	63±30.50	39-91.5	61.5	0.0348*
Monocytes-macrophages (%)	17.3±33.2	1-9	1	11.09±23.20	1-8.5	1	0.8212
Total protein (mg/dl)	51.5±31.72	32-62	44	53.5±43.6	28-56.5	43.8	0.5564
Glucose (mg/dl)	68.4±55	57-70	62	70.8±33	59-75	64.5	0.2344

*p<0.05 Mann Whitney Test. RBC: red blood cells; WBC: white blood cells; IQR: interquartiles reference; SD: standard deviation.

found. All negative samples for the tested viruses were positive for the PRV internal control assay indicating efficient nucleic acid extraction.

Biochemical and cellular CSF characteristics of positive and negative samples are shown in Table 1. CSF samples with negative results had RBC mean of 580±2890 cell/mm³ compared to the positive samples where the mean was 36.9±183 cell/mm³ (p=0.0071).

There were higher numbers of positive samples during summer months with a median temperature of 21.5°C (Fig 2), mainly for enteroviruses. Herpesviruses were distributed along the year but its circulation was not observed during the winter months.

There were a high number of positive samples for the 4-6 age group (34%) and 7-17 age group (31%). The same distribution was observed for the cases with suspicion of acute lymphomonocytary meningitis with PCR negative results, being 234 (59%) male and 161 (41%) female patients (p=0.6677). The same pattern was observed for positive samples, 33 (57%) male and 25 (43%) female. The mean age of patients for positive enteroviruses was 6±5 years old and for herpesviruses 11±14 years old. Table

2 shows the age intervals for positive and negative samples. The percentage for positive and negative samples, was great for 4-17 age group (296/453) (p=0.0012). It is noteworthy, enterovirus positive samples (48/59) the mean age was 6±5 years and for herpesviruses (10/58)

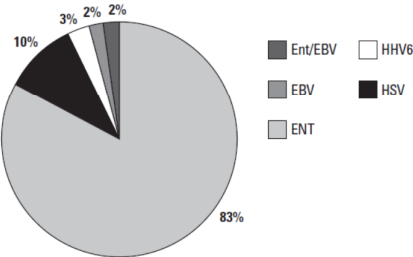
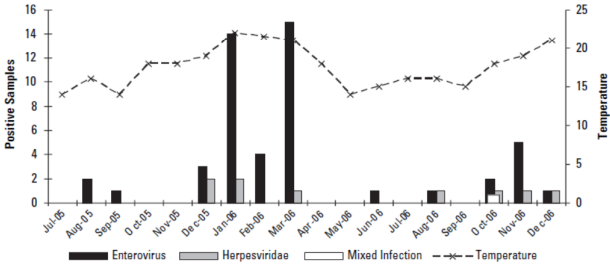
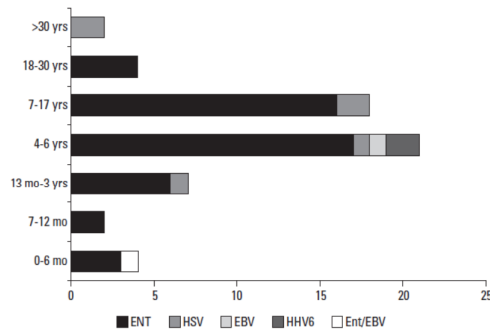


Fig 1. Percentage for positive samples in the period of the study for enterovirus (ENT), herpes simplex virus (HSV) human herpes virus type 6 (HHV6) Epstein Barr virus (EBV) and mixed infection enterovirus and Epstein Barr virus (ENT/EBV).



ENT: enterovirus; HSV: herpes simplex virus; EBV: Epstein Barr virus; HHV6: human herpes virus type 6; ENT/EBV: mixed infection; Temp: average temperature.

Fig 2. Monthly distribution of positive samples and average temperature.



ENT: enterovirus; HSV: herpes simplex virus; EBV: Epstein Barr virus; HHV6: human herpes virus type 6; ENT/EBV: mixed infection.

Fig 3. Distribution of positive CSF samples by age.

were 11 ± 14 years old ($p=0.7645$). The mean age for negative patients was 7 ± 7.5 years old. Fig 3 shows the distribution of positive samples according to age. Enterovirus was present in all ages under 30 years. However, positive samples were more prevalent in the ages of 4-17 age group (66.8%). On the other hand, positivity for *Herpesviridae* family was lower with proportional distribution in all ages. The mixed infection with enterovirus and Epstein Barr virus was observed in a 3 month old child.

DISCUSSION

There is little information on viral infections of the CNS in Southern Brazil. The findings of the present study have contributed to a better understanding of the epidemiology of these viruses in this region. We showed here that enterovirus is the main etiologic agent of viral meningitis in Curitiba and probably in the south Brazil, which is in accordance with different reports for other geographic regions^{11,12}. The circulation of the enterovirus occurred mainly in the summer and autumn similarly to that described for the northern hemisphere. In temperate climates the EVs appear markedly during summer/autumn seasonality. However, a high year-round incidence occurs in tropical and subtropical areas. It is believed that fecal-oral spread of these agents is facilitated, particularly among children, during periods of warm weather. In addition to direct person to person transmission, EVs may be recovered from houseflies, wastewater and sewage¹³. Our data is in agreement with those different authors who affirm the importance of establishing a diagnostic tool for patient management as well as carrying out epidemiological analysis to monitor the reappearance of new strains and epidemics by

Table 2. CSF negatives and positives samples from patients. epidemiological characteristics.

	Enterovirus (n=48)	Family Herpesviridae (n=10)	Negative (n=395)
Gender			
M	26 (54%)	7 (70%)	234 (59%)
F	22 (46%)	3 (30%)	161 (41%)
Distribution by age			
0-6 mo	3 (6.25%)	0 (10%)	15 (3.8%)
7-12 mo	2 (4.16%)	2 (20%)	37 (9.4%)
13 mo-3 yrs	6 (12.5%)	0	67 (17%)
4-6 yrs	17 (35.4%)	3 (30%)	132 (33.4%)
7-17 yrs	16 (33.3%)	2 (20%)	131 (33.1%)
18-30 yrs	4 (8.39%)	1 (10%)	6 (1.5%)
>30 yrs	0	2 (20%)	7 (1.8%)

Kruskal Wallis: $p=0.0012$.

enteroviruses^{14,15}. Santos et al. described the frequency of enterovirus meningitis analyzing CSF samples collected in 11 states in Brazil¹⁶. Enterovirus was detected in 15.8% of them with a predominance of Echovirus type 30, and five meningitis outbreaks were identified during the study period from 1998 to 2003. The authors pointed out the importance of evaluating epidemiological features responsible for the frequency of viral meningitis and phylogenetic relationships between serotypes in Brazil¹⁶. Mendonza et al. described virus involvement in SNC infections in Brazil¹⁷. This analysis was performed in 200 CSF samples and viral genome was detected in 23.34%, which includes CMV (6%), HSV1 (5%), VZV and EBV (0.5%) and enterovirus (11.34%)¹⁷. Another study in northern Brazil found 13.2% of positive CSF samples for enterovirus using cellular culture, immunofluorescence and neutralization test. The authors reported the importance of determining a national picture of viral meningitis in Brazil since it is still incomplete¹⁸. Despite the use of different methodologies, the proportion of positive samples was similar to that observed in this study. The incidence of the different viruses varies globally according to different populations, methodologies and objectives of the study. Enteroviruses detected by molecular biology RT-PCR or Real Time PCR or cellular culture analysis show an incidence varying from 10 to 46%^{9,12,15,17,19}. Herpesviruses, HHV6, VZV, and a mixed infection by HHV6/EV, were detected in a lower proportion²⁰⁻²². In the present study in addition to enterovirus, positive samples for HSV (10%), EBV (3%) and HHV6 (3%) were observed. Several studies have already shown mixed infection²³. The involvement of herpesviruses as etiologic agents of meningitis or encephalitis has been

extensively described in immunocompetent as well as immunosuppressed patients²³⁻²⁵. Some authors report the difficulty to distinguish aseptic from bacterial meningitis due to the overlap of clinical symptoms and laboratory findings^{26,27}. In this context, CSF examination is an essential part of the diagnostic analysis of patients with suspected CNS viral infection²⁸. The classical pattern of viral meningitis is an increase of CSF WBCs, lymphomonocytary with normal glucose and elevated lactic acid. However, in the very acute stages of viral meningitis, chiefly in enteroviral meningitis, polymorphonuclear granulocytes may predominate and shifts to a mononuclear pleocytosis within 6 hours^{27,29}. These patients also have benefit with the virus PCR analysis of CSF, as if the reaction is positive the patient is not submitted to antibiotic therapy and has prompt hospital discharge¹⁹. PCR has been proved to be a key method to detect viral infections of the CNS²⁸. Molecular biology analysis offers advantages over cellular culture, because several days are taken for viral growth and identification using the latter method³⁰. The use of PCR based on the search of specific gene sequence 5'-UTR, a highly conserved region for different serotypes for enterovirus, demonstrates the advantage of this methodology since the results can be obtained in hours providing support in clinical practice and patient management, e.g. the use of antibiotics or the benefits of hospitalization³¹. Herpesviruses analysis by PCR has been found to present high sensitivity and sensibility and has definitely revolutionized virological diagnosis^{28,31-33}. Prior to PCR, the viral diagnosis of CNS infection was based on cellular culture of the CSF, brain biopsy or the demonstration of intrathecal antibody response, so that, in many instances the positive diagnosis was retrospective³⁴. PCR has been largely used for CSF diagnosis with great advantages since it is possible to recover, amplify and detect low copies of the virus genome. In this study, DNA/RNA extraction was done as soon as possible to preserve and recover the viral genome from the CSF samples under PCR analysis. The material used for the procedure was DNA/RNase free to minimize the inhibition factors for PCR analysis.

The high number of CSF samples negative for the viruses studied suggests other causes of lymphomonocytary meningitis, although less prevalent, could be associated. Other infectious agents such as *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Cryptococcus neoformans*, *Lysteria monocytogenes*, *Brucella spp.*, *Mycoplasma*, neurocysticercosis, leptospirosis or non infectious conditions including autoimmune diseases and carcinomatous meningitis must be considered²⁹. Also other viruses not detected by PCR included adenovirus, HIV, measles, rubella and mumps.

Additionally, the implication of the many inhibiting

factors in PCR results is well known. In CSF samples collected less than 3 days after the onset of neurological symptoms only 12% showed positive results. A higher positivity was observed on the fourth or fifth day³⁴. In our study most of the CSF samples were collected on the second day (median 12hs) which could explain the high number of negative samples. Additionally, the elevated number of RBC cells ($p=0.0071$), due to traumatic lumbar puncture, in the CSF's samples, as well as the presence of hemoglobin, probably had an inhibitory effect showing false negative results. We excluded from this analysis CSF samples with predomination of neutrophils, as the aim of this study was lymphomonocytary meningitis. This could have little impact in the number of positive PCR samples as the samples included in this study were collected with a mean of 12 hrs.

Finally, PCR analysis must include strict criteria in order to assure an accurate diagnosis. The standardization of the molecular technique confirms the validity of the PCR method for the rapid detection of RNA enterovirus and DNA herpesvirus in CSF. Enterovirus PCR takes eight hours and pan-herpes PCR takes four and a half hour. Further analysis of other agents and the standardization of biology molecular methodologies such as Real Time PCR are future proposition to improve the laboratorial diagnosis of viral meningitis in Brazil.

REFERENCES

1. Brown B, Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species c are closely related in the noncapsid coding region. *J Virology* 2003;77:8973-8984.
2. Sawyer MH. Enterovirus Infections: diagnosis and treatment. *Seminars in pediatrics infectious diseases* 2002;53:40-47.
3. Chadwick DR, Lever AML. The impact of new diagnostic methodologies in the management of meningitis in adults at a teaching hospital. *Quart J Med* 2000;95:663-670.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Sistema de Informações de Saúde [updated 2007 Feb 01]. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br>.
5. Kupila L, Vuorinen T, Vainionpää R, Hukkinen V, Marttila RJ, Kotilainen P. Etiology of aseptic meningitis and encephalitis in an adult population. *Neurology* 2006;66:75-80.
6. Steiner I, Budka H, Chaudhuri A, et al. Viral encephalitis: a review of diagnostics methods and guidelines for management. *Eur J Neurol* 2005; 12:331-343.
7. Casas I, Powell L, Klapper P, Cleator G. New Method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Meth* 1995;53:25-36.
8. Casas I, Tenorio A, Echevarría JM, Klapper PE, Cleator GM. Detection of enteroviral RNA and specific DNA of herpesviruses by multiplex genome amplification. *J Virol Meth* 1997;66:39-50.
9. Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarría JM, Tenorio A. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for Enterovirus and Herpesviruses in a prospective study. *J Med Virol* 1999;57:145-151.
10. Johnson G, Nelson S, Petric M, Tellier R. Comprehensive PCR-based assay for detection and species identification of human herpesviruses. *J Clin Microbiol* 2000;38:3274-3279.
11. Berlin L, Rorabaugh ML, Heldrich F, Roberts K, Doran T, Modlin J. Aseptic meningitis in infants <2 years of age: diagnosis and etiology. *J Infect Dis* 1993;168:888-892.
12. Archimbaud C, Chambon M, Bailly JJ, et al. Impact of rapid enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic meningitis. *J Med Virol* 2009;81:42-48.

13. Klowdenm M, Greenberg B. House fly and *Drosophila* cell cultures as hosts for human enteroviruses. *J Med Entomol* 1974;4:428-432.
14. Colimon R. Introduction to the virological diagnosis of the most frequent infections of the central nervous system. *J Clin Virol* 2002;25:51-53.
15. Shoja Z, Tabatabai H, Sarijloo M, Shahmahmoodi S, Azad TM, Nategh R. Detection of enteroviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction in cell culture negative stool specimens of patients with acute flaccid paralysis. *J Virol Meth* 2007;142:95-97.
16. Santos GPI, Skraba I, Oliveira D, et al. Enterovirus meningitis in Brazil, 1998-2003. *J Med Virol* 2006;78:98-104.
17. Mendonza LP, Bronzoni R, Takayanagui OM, Aquino VH, Figueiredo LTM. Viral infections of the central nervous system in Brazil. *J Infect* 2006;54:6.
18. Lmarão LM, Gomes MLC, Ferreira LLA, et al. Pesquisa de enterovirus em casos de síndrome de meningite asséptica de Belém, PA. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38:391-395.
19. King RL, Lorch AS, Cohen DM, Hodinka RL, Cohn KA, Shah S. Routine cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction testing reduces hospitalization and antibiotic use for infants 90 days of age or younger. *Pediatrics* 2007;120:489-496.
20. Michos AG, Syriopoulou VP, Hadjichristodoulou C, et al. Aseptic meningitis in children: analysis of 506 cases. *PLOS ONE* 2007;8:674.
21. Brunel D, Lévêque N, Jacques J, Renois F, Motte J, Andréoletti L. Clinical and virological features of an aseptic meningitis outbreak in North-Eastern France, 2005. *J Clin Virol* 2008;42:225-228.
22. Takavoli NP, Wang H, Nattanmai S, Dupuis M, Fusco H, Hull R. Detection and typing of enteroviruses from CSF specimens from patients diagnosed with meningitis/encephalitis. *J Clin Virol* 2008;43:207-211.
23. Frantzidou F, Kamaria F, Dumaidi K, Skoura I, Antoniadis A, Papa A. Aseptic meningitis and encephalitis because of herpesviruses and enteroviruses in an immunocompetent adult population. *Eur J Neurol* 2008;15:995-997.
24. Gilden DH, Mahalingam R, Cohrs RJ, Tyler KL. Herpesvirus infections of the nervous system. *Nat Clin Pract* 2007;3:82-94.
25. Berger JK, Houff S. Neurological complications of herpes simplex virus type 2 infection. Clinical implications of basic neuroscience research 2008;63: 396-399.
26. Almeida SM, Faria FL, Fontes KG, et al. Quantitation of cerebrospinal fluid lactic acid in infectious and non-infectious neurological diseases. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:755-761.
27. Shah SS, Hodinka RL, Turnquist JL, Elliott MR, Coffin SE. Cerebrospinal fluid mononuclear cell predominance is not related to symptom duration in children with enteroviral meningitis. *J Pediatrics* 2006;148:118-121.
28. Cinque P, Bossolasco S, Lundkvist A. Molecular analysis of cerebrospinal fluid in viral diseases of the central nervous system. *J Clin Virol* 2003;26: 1-28.
29. Almeida S M, Nogueira M B, Raboni S M, Vidal L R R. Laboratorial diagnosis of lymphocytic meningitis. *Brazilian J Infect Dis* 2007;11:478-484.
30. Ramers C, Billman G, Hartin M, Ho S, Sawyer M. Impact of a diagnostic cerebrospinal fluid enterovirus polymerase chain reaction test on patient management. *J Amer Med Associat* 2000;283:2680-2685.
31. DeBiasi RL, Tyler KL. Molecular methods for diagnosis of viral encephalitis. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:903-925.
32. Chesky M, Scalco R, Failace L, Read S, Jobim LF. Polymerase chain reaction for the laboratory diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis. *Arq Neuropsiquiatr* 2000;58:836-842.
33. Minjolle S, Arvieux C, Gautier AL, et al. Detection of herpesvirus genomes by polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid and clinical findings. *J Clin Virol* 2002; 25(Suppl):S59-S70.
34. Davies NWS, Brown LJ, Gonde J, et al. Factors influencing PCR detection of viruses in cerebrospinal fluid of patients with suspected CNS infections. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:82-87.